

Aus dem Institut für Virologie  
Direktor: Prof. Dr. Stephan Becker

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

# **Charakterisierung der Rolle des endosomalen Recycling-Systems für den intrazellulären Transport des Marburg Virus Glykoproteins**

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der  
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Sandro Halwe**  
aus Lübbecke

Marburg, im Mai 2019

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurden vom Februar 2015 bis März 2019 am Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Stephan Becker durchgeführt.

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:  
24.09.2019

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. Stephan Becker

Korreferent: Prof. Dr. Ralf Jacob

***Für meine Familie***

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>10</b>
2.1	Taxonomie und Epidemiologie des Marburg Virus .....	10
2.2	Transmission und Klinik.....	12
2.3	Antivirale Therapien und Vakzinen .....	13
2.4	Morphologie und Genomstruktur des Marburg Virus .....	15
2.5	Virale Strukturproteine.....	17
2.6	Replikationszyklus des Marburg Virus.....	23
2.7	Virale Strategien zur Instrumentalisierung des intrazellulären Transportsystems der Wirtszelle .....	26
2.7.1	Interaktionen zwischen Viren und dem Zytoskelett.....	27
2.7.2	Der sekretorische Pfad im viralen Replikationszyklus .....	28
2.7.3	Sortierung im <i>trans</i> -Golgi-Netzwerk und <i>post</i> -Golgi-Transport.....	29
2.7.4	Die Bedeutung des endosomalen Recycling Systems für den Transport viraler Komponenten.....	30
2.8	Fragestellung .....	33
<b>3</b>	<b>Material.....</b>	<b>35</b>
3.1	Chemikalien .....	35
3.2	Verbrauchsmaterialien .....	36
3.3	Kits .....	37
3.4	Geräte .....	37
3.5	Puffer und Lösungen .....	38
3.5.1	Puffer .....	38
3.5.2	Lösungen.....	40
3.5.3	Substratlösungen für Western Blot-Analysen .....	41
3.6	Wachstumsmedien.....	41
3.6.1	Wachstumsmedien für Bakterienzellen .....	41
3.6.2	Zellkulturmedien .....	41
3.7	Nukleotide und Nukleinsäuren.....	42
3.7.1	DNA-Größenmarker, freie Nukleotide und Random Primer .....	42
3.7.2	DNA-Oligonukleotide (Primer für PCR/Sequenzierungen) .....	43
3.7.3	„ <i>small interfering RNAs</i> “ (siRNAs) .....	44
3.8	Vektoren und rekombinante Plasmide .....	44
3.9	Proteine und Peptide.....	45
3.9.1	Enzyme und Proteine.....	45
3.9.2	Proteinmarker.....	45
3.9.3	Antikörper.....	46



3.10	Zellen .....	48
3.10.1	Prokaryotische Zellen .....	48
3.10.2	Eukaryotische Zellen.....	48
3.11	Viren .....	48
3.12	Software .....	49
3.13	Plugins und Makros für ImageJ/Fiji .....	49
<b>4</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>50</b>
4.1	Molekularbiologische Methoden .....	50
4.1.1	Amplifikation von spezifischen DNA-Sequenzen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	50
4.1.2	Ortsgerichtete Mutagenese von Plasmid-DNA .....	50
4.1.3	Aufreinigung von Nukleinsäuren .....	50
4.1.4	Analytische und präparative Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren.....	51
4.1.5	Extraktion von DNA aus Agarosegelen .....	51
4.1.6	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	51
4.1.7	Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNA .....	51
4.1.8	Ligation von DNA-Fragmenten und linearisierten Vektoren.....	51
4.1.9	Transformation von Plasmid-DNA in bakterielle Zellen .....	52
4.1.10	Kultivierung und Selektion rekombinanter Bakterienzellen .....	52
4.1.11	Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen.....	52
4.1.12	Konzentrations- und Reinheitsanalysen von DNA.....	52
4.1.13	DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode.....	53
4.2	Proteinbiochemische Methoden.....	53
4.2.1	Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	53
4.2.2	Proteintransfer mittels Western Blot (WB) und Immundetektion.....	53
4.3	Zellbiologische Methoden .....	54
4.3.1	Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen .....	54
4.3.2	Ernte von Zellen für die Analyse im Western Blot (WB).....	55
4.3.3	Oberflächenbiotinylierungs-Assay (OBA) .....	55
4.3.4	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von intrazellulären Proteinen.....	56
4.3.5	Native indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Oberflächenproteinen.....	58
4.3.6	Antikörper-Aufnahme-Assay .....	58
4.3.7	Lebendzellmikroskopie.....	59
4.3.8	siRNA-vermittelte Depletion von zellulären Proteinen .....	59
4.3.9	Monensin-Behandlung zur Blockierung des Transports aus dem Golgi-Apparat .....	60
4.4	Virologische Methoden .....	60
4.4.1	Marburg Virus-Anzucht .....	60

4.4.2	Marburg Virus-Infektion .....	61
4.4.3	Immuno-Plaque-Assay .....	61
4.4.4	„Tissue Culture Infectious Dose 50“ (TCID <sub>50</sub> )-Assay .....	62
4.5	Quantifizierung von Immunfluoreszenz-Daten .....	62
4.5.1	Pearson's Korrelationskoeffizient ( <i>Pixel-basierte Kolokalisationsanalyse</i> ) .....	63
4.5.2	Objekt-basierte Kolokalisationsanalyse.....	63
4.5.3	Intensitätsmessungen von Immunfluoreszenz-Daten.....	64
4.6	Statistische Methoden.....	65
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>66</b>
5.1	Analyse der subzellulären Lokalisation des Marburg Virus Glykoproteins .....	66
5.1.1	Komparative Kolokalisationsanalyse des Marburg Virus-Glykoproteins und endosomalen Markerproteinen in transient transfizierten Zellen .....	66
5.1.2	Untersuchung der Assoziation VP40-reicher Membrancluster mit dem Marburg Virus Glykoprotein und endosomalen Markerproteinen in transfizierten Zellen.....	73
5.1.3	Untersuchung der Assoziation des Marburg Virus Glykoproteins und VP40 mit endosomalen Markerproteinen in Marburg Virus-infizierten Zellen.....	76
5.2	Charakterisierung der funktionellen Bedeutung des endosomalen Recycling-Systems für den Transport des Marburg Virus-Glykoproteins.....	82
5.2.1	Analyse des Ko-Transports des Marburg Virus-Glykoproteins und Rab11 mittels Lebendzellmikroskopie .....	83
5.2.2	Einfluss der Inhibition von Rab11 auf den Transport des Marburg Virus Glykoproteins .....	85
5.2.3	Einfluss der Expression dominant-negativer Mutanten der Myosin V-Familie auf die intrazelluläre Verteilung des Marburg Virus-Glykoproteins .....	91
5.2.4	Charakterisierung der Myosin Vb Tail-induzierten perinukleären Aggregationen .....	99
5.2.5	Einfluss der Expression dominant-negativer Mutanten der Myosin V-Familie auf den Transport des Marburg Virus Glykoproteins zur Zelloberfläche .....	103
5.2.6	Einfluss der Expression dominant-negativer Mutanten der Myosin V-Familie auf den Transport des Marburg Virus-Glykoproteins zu VP40-reichen Membranclustern .....	108
5.3	Vergleich des Transports des Marburg Virus-Glykoproteins mit anderen Oberflächenproteinen verschiedener Negativstrang-RNA-Viren.....	111
5.4	Zusammenfassung.....	115
<b>6</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>117</b>
6.1	Die Kolokalisationsanalyse des Marburg Virus-Glykoproteins und zellulären Markerproteinen deutet auf einen Transit des Glykoproteins durch das endosomale Recycling-System .....	117
6.2	Die funktionelle Ablation des Myosin Vb-assoziierten endosomalen Recycling-Systems inhibiert den Oberflächentransport des Marburg Virus-Glykoproteins.....	120
6.3	Zelluläre Transportregulatoren des endosomalen Recycling-Systems im Zusammenspiel mit dem Marburg Virus-Glykoprotein .....	122
6.3.1	Die Rolle des Motorproteins Myosin Vb für den Transport des Marburg Virus Glykoproteins .....	122

6.3.2	Die Rolle der kleinen GTPase Rab11 für den Transport des Marburg Virus Glykoproteins .....	122
6.3.3	Alternative Rab-GTPasen im endosomalen Recycling-System mit einer möglichen Funktion für den Transport des Marburg Virus Glykoproteins .....	125
6.4	Der Transport des Marburg Virus-Glykoproteins in Anwesenheit des Matrixproteins VP40.....	128
6.5	Die Rolle des Myosin Vb-assoziierten Recycling-Systems für den Transport weiterer viraler Oberflächenproteine .....	134
6.6	Abschließende Bemerkungen.....	135
<b>7</b>	<b>Referenzen .....</b>	<b>139</b>
<b>I</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>161</b>
<b>II</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>163</b>
<b>III</b>	<b>Verzeichnis der Videos .....</b>	<b>164</b>
<b>IV</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>165</b>
<b>V</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>169</b>
<b>VI</b>	<b>Publikationen.....</b>	<b>170</b>
<b>VII</b>	<b>Verzeichnis der akademischen Lehrer .....</b>	<b>173</b>
<b>VIII</b>	<b>Ehrenwörtliche Erklärung .....</b>	<b>174</b>
<b>IX</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>175</b>

## 1 Zusammenfassung

Das Marburg Virus (MARV), das zur Familie der *Filoviridae* gezählt wird, ist ein Erreger schwerer Fieber mit Letalitätsraten von bis zu 90 %. Das Glykoprotein GP stellt das einzige Oberflächenprotein des MARV dar und daher ist sein korrekter Transport zu den „*Budding-Sites*“ an der Plasmamembran sowie seine Inkorporation in neue Viruspartikel essentiell für den viralen Infektionszyklus. Das aktuelle Modell beschreibt einen Transport von GP über den klassischen sekretorischen Pfad, der das endoplasmatische Retikulum, den Golgi-Apparat und das *trans*-Golgi-Netzwerk einschließt. Dennoch sind weder die exakten Transportschritte zwischen dem Golgi-Apparat und der Plasmamembran noch Wirtsfaktoren, die diesen Prozess vermitteln, bekannt. Aus diesem Grund war das Ziel dieser Studie, den *post*-Golgi-Transport von MARV-GP näher zu charakterisieren und potentielle subzelluläre Kompartimente sowie Wirtsfaktoren zu identifizieren, die die Beförderung von MARV-GP zur Zelloberfläche im Allgemeinen und zu den VP40-reichen „*Budding-Sites*“ im Besonderen vermitteln.

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte mittels konfokaler Mikroskopie gezeigt werden, dass MARV-GP mit Markerproteinen von Recycling Endosomen (Transferrin-Rezeptor, GFP-Rab11) sowohl in transient transfizierten als auch in MARV-infizierten Zellen kolokalisiert. Da eine Re-Endozytose von der Plasmamembran ausgeschlossen werden konnte, deuteten diese Ergebnisse auf eine Rolle des endosomalen Recycling-Systems innerhalb des „biosynthetischen“ Transports von GP zwischen dem Golgi-Apparat und der Zelloberfläche. Im zweiten Teil konnte nachgewiesen werden, dass die funktionelle Ablation des endosomalen Recycling-Systems durch die Überexpression einer dominant-negativen Mutante von Myosin Vb (Myosin Vb Tail) zu einer aberranten Verteilung von GP führt, das in der Folge innerhalb oder in der Nähe von perinukleären Myosin Vb Tail-Aggregaten akkumuliert. Infolge einer Blockade des Transports von GP aus dem Golgi-Apparat, konnte weiter aufgedeckt werden, dass GP das Myosin Vb-positive Kompartiment nach Verlassen des Golgi-Apparats erreicht. Die Interferenz des GP-Transports durch das dominant-negative Myosin Vb Tail reduzierte darüber hinaus signifikant die GP-Level an der Zelloberfläche im Allgemeinen und in VP40-reichen Regionen an der Plasmamembran im Besonderen. Im Gegensatz dazu beeinträchtigte die Expression von Myosin Vb Tail weder die Verteilung des MARV Matrixproteins VP40 noch von MARV-NP als Hauptkomponente der viralen Nukleokapside, was für die Nutzung distinkter Transportwege durch MARV-GP und den anderen viralen Strukturproteinen spricht. Überraschenderweise hatte die Inhibition von Rab11, einem bedeutenden Regulator von Myosin Vb, durch die Überexpression dominant-negativer bzw. konstitutiv-aktiver Mutanten oder durch eine siRNA-vermittelte Depletion keinen Einfluss auf die Verteilung oder die Oberflächenexpression von GP, was darauf hindeutet, dass Rab11 nicht essentiell für den Transport von MARV-GP ist.

Zusammengefasst sprechen diese Ergebnisse dafür, dass MARV-GP nach dem Verlassen des Golgi-Apparats das Myosin Vb-assoziierte endosomale Recycling-System passiert. Ein korrekter Transport durch das Recycling-System ist substantiell für die Beförderung von GP zur Zelloberfläche sowie zu den VP40-angereicherten Plasmamembranregionen und daher eine wichtige Komponente bei der Bildung der Partikelhülle des MARV.

## 1 Summary

Marburg virus (MARV), belonging to the family *Filoviridae*, is the causative agent of severe fever with lethality rates of up to 90%. The glycoprotein GP represents the only surface protein of MARV and thus its proper transport to the budding-sites at the plasma membrane and subsequent incorporation into virus particles is essential for the viral infection cycle. Regarding delivery to the cell surface the current model presumes trafficking of GP via the classical secretory pathway involving endoplasmic reticulum, Golgi apparatus and *trans*-Golgi-network. However, neither the exact transport steps between the Golgi apparatus and the plasma membrane nor host factors regulating trafficking of GP are known. Therefore, the aim of this study was to characterize the *post*-Golgi transport of MARV-GP and to identify potential subcellular compartments and host factors mediating trafficking of GP to the cell surface in general and to the VP40-enriched budding-sites in particular.

In the first part of this thesis, it was shown by confocal microscopy that MARV-GP colocalizes with marker proteins of recycling endosomes (Transferrin receptor, GFP-Rab11) in transiently transfected as well as in MARV-infected cells. Since a re-endocytosis from the plasma membrane could be excluded, these results were a hint for a role of the endosomal recycling system during biosynthetic transport of GP between the Golgi apparatus and the cell surface. In the second part, it was demonstrated that functional ablation of the endosomal recycling system by overexpressing a dominant-negative mutant of Myosin Vb (Myosin Vb Tail) leads to an aberrant distribution of GP which as a consequence accumulates in or near perinuclear Myosin Vb Tail aggregates. By blocking GP exit from the Golgi apparatus, it was further shown that GP enters the Myosin Vb-positive compartment after leaving the Golgi. Furthermore, the interference with GP trafficking by dominant-negative Myosin Vb Tail significantly reduced GP levels at the cell surface in general and targeting of GP to VP40-enriched sites at the plasma membrane in particular. In contrast, distribution of MARV matrix protein VP40 as well as of MARV-NP, the major component of viral nucleocapsids, were not affected by the expression of Myosin Vb Tail pointing towards the use of distinct trafficking pathways by MARV-GP and the other viral structural proteins. Surprisingly, inhibition of Rab11, a major Myosin Vb regulator, by overexpression of dominant-negative or constitutively active mutants or siRNA-mediated knockdown did not perturb GP distribution or surface transport indicating that Rab11 is not essential for MARV-GP transport.

In sum, these results suggest that after leaving the Golgi apparatus MARV-GP transits the Myosin Vb-associated endosomal recycling system. A proper transit through the recycling system is critical for GP transport to the cell surface as well as for its targeting to plasma membrane regions enriched in the matrix protein VP40 and therefore an important step during the formation of the MARV envelope.

## 2 Einleitung

### 2.1 Taxonomie und Epidemiologie des Marburg Virus

Das Marburg Virus (MARV) wird taxonomisch gemeinsam mit dem eng verwandten Ebola Virus (EBOV) in die Familie der *Filoviridae* eingeordnet, deren Name auf der charakteristischen fadenförmigen Erscheinung der Viruspartikel in elektronenmikroskopischen Aufnahmen beruht (Abb. 2.3; Kiley et al., 1982). Innerhalb der Filoviren beinhaltet die Gattung MARV die einzelne Spezies *Marburg marburgvirus* mit den Viren Marburg Virus und Ravn Virus, während die Gattung *Ebolavirus* die fünf Spezies *Bundibugyo ebolavirus*, *Reston ebolavirus*, *Sudan ebolavirus*, *Tai Forest ebolavirus* sowie *Zaire ebolavirus* umfasst (Abb. 2.1; Maes et al., 2019). In den letzten Jahren konnte zudem eine Reihe weiterer Viren in Europa und China identifiziert werden, die in die Familie der *Filoviridae* aufgenommen wurden (Lloviu Virus in der Gattung *Cuevavirus*; Negrodo et al., 2011; Maes et al., 2019) oder deren Aufnahme vorgeschlagen wurde (Měnglà Virus; Yang et al., 2019). Aufgrund seiner hohen Pathogenität und dem Fehlen von zugelassenen Therapien und Impfstoffen wird das MARV in die höchste biologische Sicherheitsstufe (BSL-4) kategorisiert (TRBA 462 "Einstufung von Viren in Risikogruppen", 2012).

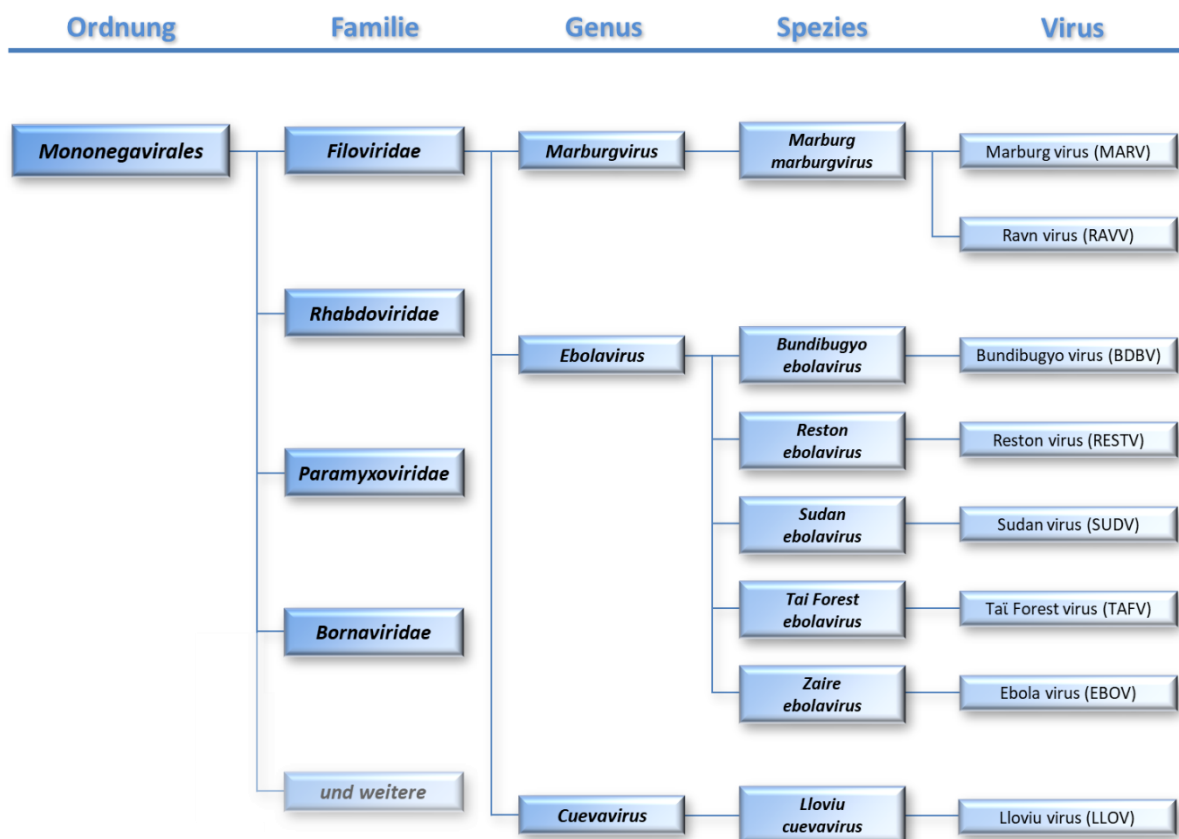
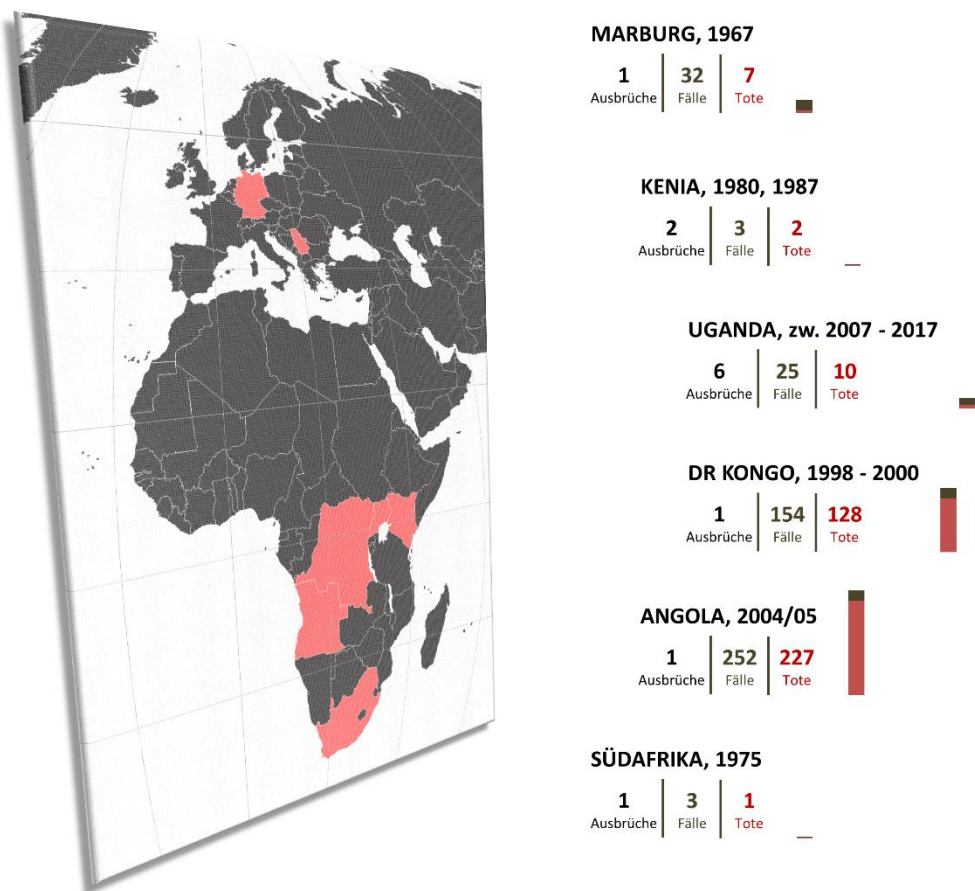


Abb. 2.1: Taxonomie der Filoviren in der Ordnung Mononegavirales (nach Maes et al., 2019).

Auf molekularer Ebene besitzen Filoviren ein einzelsträngiges, nicht segmentiertes RNA-Genom in negativer Polarität und werden daher in die Ordnung *Mononegavirales* klassifiziert, die eine Vielzahl für den Menschen bedeutsame Virusfamilien wie die *Rhabdoviridae* (Rabies Virus) oder die *Paramyxoviridae* (Masern Virus, Nipah Virus) umfasst (Abb. 2.1; Maes et al., 2019).

Der erste bekannte Ausbruch des MARV datiert auf das Jahr 1967, als in der namensgebenden Stadt Marburg an der Lahn (Deutschland) mehrere Labormitarbeiter der ortsansässigen Behringwerke schwere, fieberhafte Infektionen mit unbekannter Ursache entwickelten (Siegert et al., 1967). Die



**Abb. 2.2: Geographische Lokalisation und Fallzahlen der MARV Ausbrüche von 1967 bis 2017.**

Links: Geographische Karte von Europa und Afrika. Rot markierte Länder haben in der Vergangenheit MARV-Ausbrüche gemeldet. Rechts: Auflistung aller MARV-Ausbrüche nach Ländern. Fallzahlen (grau) und Todesfälle (rot) sind als absolute Zahlen und in Form eines Balkendiagramms angegeben. Nicht aufgeführt ist eine 1990 in Russland aufgetretene Laborinfektion (Nikiforov et al., 1994). Die geographische Karte basiert auf der Mollweide-Weltkarte (0°) der Webseite [www.mygeo.info](http://www.mygeo.info) (CC BY 3.0-Lizenz). Fallzahlen sind entnommen aus Slenczka und Klenk, 2007; CDC, 2014; WHO, 2017.

Krankheit betraf insgesamt 32 Patienten in Marburg, Frankfurt und Belgrad, von denen sieben verstarben (Letalitätsrate 22 %; Slenczka und Klenk, 2007). Von der Lokalzeitung zunächst als „mysteriöse Erkrankung“ betitelt (Oberhessische Presse, 24.08.1967), stellte sich wenig später heraus, dass es sich bei dem Erreger um ein neuartiges Virus handelte, das über für die Produktion des



Polioimpfstoffes aus Uganda importierte Äthiopische Grünmeerkatzen (*Chlorocebus aethiops*) seinen Weg nach Europa gefunden hatte (Siegert et al., 1967; Siegert et al., 1968; Luby und Sanders, 1969; Slenczka und Klenk, 2007; Brauburger et al., 2012). Im Anschluss an diese ersten dokumentierten Fälle in Europa, kam es immer wieder zu sporadischen MARV-Ausbrüchen vor allem in Zentral- und Ostafrika, zuletzt im Oktober 2017 in Uganda (CDC, 2014; WHO, 2017). Die Letalitätsraten der MARV-Ausbrüche mit mehr als einem Fall lagen dabei zwischen 25 % (Uganda, 2007; Adjemian et al., 2011) und 90 % (Angola, 2004/2005; Towner et al., 2006). Abb. 2.2 gibt einen Überblick über die Lokalisation sowie die Fallzahlen der dokumentierten MARV-Ausbrüche.

Während die Infektionszahlen in vergangenen MARV-Ausbrüchen relativ gering blieben (maximal 252 Fälle in Angola 2004/2005; Towner et al., 2006), zeigen die Fallzahlen des eng verwandten EBOV, dass Filoviren eine große Bedeutung für die globale Gesundheit besitzen. Das EBOV wurde erstmals im Jahre 1976 identifiziert, als es einen Ausbruch einer den Symptomen des MARV ähnlichen Erkrankung in der heutigen Demokratischen Republik Kongo mit 318 Fällen und einer Letalitätsrate von 88 % auslöste (Bowen et al., 1977; WHO, 1978). Globale Aufmerksamkeit erfuhr das EBOV vor allem während des bisher größten Ausbruchs in Westafrika, der zwischen 2013 und 2016 für 28,652 Fälle und 11,325 Todesopfer (Letalitätsrate ca. 40 %) verantwortlich war (Bell et al., 2016). Darüber hinaus sieht sich die Demokratische Republik Kongo aktuell mit der bislang zweitgrößten EBOV-Epidemie konfrontiert, die bis zum 30. April 2019 1,495 Fälle mit 984 fatalen Verläufen zählt (Letalität 66 %; WHO, 2019).

## 2.2 Transmission und Klinik

Bei den Filoviren handelt es sich um hochpathogene, sog. zoonotische Erreger, die zwar ein Tier als natürlichen Reservoirwirt, d.h. als symptomlosen Träger, besitzen, die aber dennoch unter bestimmten Umständen auf den Menschen übertragen werden können. Dieses natürliche Reservoir konnte im Falle des MARV als die Flughund-Spezies *Rousettus aegyptiacus* (Nilflughund) identifiziert werden (Swanepoel et al., 2007; Towner et al., 2009) und auch im Falle des EBOV bestehen ebenfalls starke Hinweise auf eine Verbreitung in Flughunden und Fledermäusen (Leroy et al., 2005; Goldstein et al., 2018). Eine Transmission auf den Menschen setzt einen direkten Kontakt mit Körperflüssigkeiten wie Blut oder Speichel infizierter Tiere oder Menschen voraus, wobei häufig kleinere Schleimhautläsionen als Eintrittspforten dienen (Simpson et al., 1977; Brauburger et al., 2012). Aus diesem Grund besteht insbesondere ein hohes Infektionsrisiko für Personen mit engem Patientenkontakt, wie z.B. Ärzten und Krankenpflegern in den Risikogebieten oder Teilnehmern von traditionellen Beerdigungsriten, die häufig eine Berührung des Verstorbenen vorsehen (Manguvo und Mafuvadze, 2015; Selvaraj et al., 2018). MARV und EBOV konnten zudem in der Samenflüssigkeit akut infizierter wie auch bereits als geheilt geltender Patienten detektiert werden, was in der Folge zu wahrscheinlich sexuell

transmittierten Sekundärinfektionen führte, die teilweise mehrere Monate nach dem Abklingen der Symptome auftraten (Martini und Schmidt, 1968; Uyeki et al., 2016). Die Tatsache, dass die Viren zusätzlich auch in Tränenflüssigkeit und Muttermilch detektiert werden konnten, spricht für die Fähigkeit von Filoviren, eine persistente Infektion in immunologisch privilegierten Organen zu etablieren (Brauburger et al., 2012; Brainard et al., 2016; Coffin et al., 2018).

All diese Faktoren unterstreichen, dass Filovirus-Ausbrüche eine gut organisierte Identifizierung von Transmissionsketten, eine zielgerichtete Aufklärung der betroffenen Bevölkerung sowie eine adäquate protektive Ausrüstung von Ärzten und Pflegeern durch die globalen und lokalen Gesundheitsbehörden erfordern.

Die klinische Manifestation einer MARV-Infektion äußert sich im Menschen vor allem durch das Auftreten von schweren Fiebern. Dabei wird der Infektionsverlauf hauptsächlich in vier Phasen unterteilt. Nach der Inkubationszeit von 3-21 Tagen setzen zunächst initiale grippeartige Symptome mit hohem Fieber ( $> 39^{\circ}\text{C}$ ), starken Kopfschmerzen und Myalgien ein, bevor sich die Erkrankung in der frühen organischen Phase mit gastrointestinalen Beschwerden einschließlich Diarrhoe und Erbrechen fortsetzt. Auch von neurologischen Symptomen wie Enzephalitiden und Delirium wird berichtet, während sich weitere Infektionsherde insbesondere in Milz, Leber und Nieren befinden. Im Übergang zur späten organischen Phase treten durch eine erhöhte vaskuläre Permeabilität bereits erste Hämorrhagien und Petechien auf. Zu diesem Zeitpunkt entscheidet sich, ob der Patient in die Rekonvaleszenzphase oder in die klinische Endphase der Infektion eintritt. Fatale Verläufe sind final vor allem geprägt von weitreichenden metabolischen Dysfunktionen und Multiorganversagen, was letztlich den Tod zur Folge hat (Absatz inhaltlich entnommen aus Martini, 1969; Stille und Böhle et al., 1971; Mehedi et al., 2011b; Brauburger et al., 2012).

### 2.3 Antivirale Therapien und Vakzinen

Bis zum heutigen Zeitpunkt gibt es weder eine zugelassene Therapie noch einen Impfstoff gegen das MARV. Dennoch existieren einige vielversprechende, experimentelle Ansätze, die mit Blick auf das EBOV teilweise bereits in Ausbruchsszenarien erfolgreich angewendet wurden.

Als aussichtsreichster Kandidat für eine erfolgreiche Vakzine muss dabei das auf einem rekombinanten Vesikulären Stomatitis Virus (rVSV) basierende rVSV-ZEBOV genannt werden. Dieser Impfstoff, von dem auch eine auf das MARV abzielende Variante (rVSV-MARV) existiert, gehört zu den sog. Vektor-basierten Vakzinen, bei denen ein Immunogen des (hochpathogenen) Zielvirus in das Genom eines zweiten, weit weniger humanpathogenen Virus eingebaut wird. Dieses replikationskompetente Vektorvirus produziert im Rahmen seiner eigenen Vermehrung anschließend das fremde Immunogen, das in der Folge eine Immunreaktion des Körpers und damit eine protektive Wirkung gegen das

Zielvirus induziert (Überblick in Humphrey und Sebastian, 2018). Im Falle der gegen Filoviren gerichteten rVSV-Impfstoffe wird das stark immunogene Oberflächen-Glykoprotein GP des MARV bzw. EBOV in das VSV-Genom eingeführt, woraufhin die neuen rekombinanten VSV-Partikel das GP in neue, freigesetzte Virionen einbauen (Jones et al., 2005; Marzi et al., 2011; Geisbert und Feldmann, 2011). Während eine Infektion mit VSV beim Menschen generell nur eine milde oder gar keine Symptomatik nach sich zieht, wird dem Immunsystem gleichzeitig durch die GP-tragenden Viren das filovirale Immunogen präsentiert (Brandly und Hanson, 1957; Geisbert und Feldman, 2011). Dies führt in der Folge zum Aufbau einer starken humoralen wie auch zellulären Immunreaktion, die in Nicht-menschlichen Primaten (NHPs) einen verlässlichen Schutz gegen die Infektion mit MARV und EBOV generierte (Jones et al., 2005; Marzi et al., 2011; Geisbert und Feldmann, 2011; Marzi et al., 2019). Interessanterweise konnte sogar eine, wenn auch limitierte, Wirkung der rVSV-Impfstoffe in Form einer Postexpositions-Behandlung beobachtet werden (Marzi et al., 2011; Geisbert und Feldmann, 2011; Marzi et al., 2016). Während des EBOV-Ausbruchs 2013-2016 in Westafrika wurde der rVSV-ZEBOV-Impfstoff im Rahmen einer als Ringvakzinierung angelegten klinischen Studie für die Verwendung im Menschen getestet und erzielte dabei eine sehr gute Wirksamkeit (Henao-Restrepo et al., 2015). Momentan befindet sich der Impfstoff in der klinischen Phase III (Henao-Restrepo et al., 2017).

Weitere Impfstoffkandidaten, die sich zur Zeit in der klinischen Entwicklung befinden, umfassen u.a. das auf einem attenuierten Schimpansen-Adenovirus-basierende ChAd3-ZEBOV oder einen Kombinationsimpfstoff, der das Adenovirus 26 sowie das modifizierte Vaccinia Virus Ankara als Vektor nutzt (De Santis et al., 2016; Milligan et al., 2016; Domi et al., 2018; Überblick in Mire et al., 2016).

Auch auf dem Feld der anti-filoviralen Therapie wurden in den letzten Jahren enorme Fortschritte erzielt. So zeigte sich ein Cocktail aus verschiedenen monoklonalen Antikörpern gegen EBOV-GP (ZMapp) als effektiv im NHP-Modell gegen EBOV (Qiu et al., 2014; Davidson et al., 2015) und wurde auch bereits in Ausbruchsszenarien eingesetzt. In einer an 72 Patienten durchgeführten klinischen Studie in Westafrika verringerte der Einsatz des Medikaments zwar die Mortalität, konnte die statistischen Kriterien zu einer Überlegenheit gegenüber einer symptomatischen Therapie plus orale Applikation von Favipiravir (s.u.) jedoch nicht erfüllen (Davey et al., 2016).

Ein weiterer aussichtsreicher Kandidat ist das Favipiravir, ein Inhibitor der RNA-abhängigen RNA-Polymerase diverser RNA-Viren, das aufgrund seiner Wirkweise als potentiell Breitspektrum-Virostatikum gehandelt wird (Furuta et al., 2013; 2017). Im Hinblick auf eine antivirale Aktivität gegenüber Filoviren zeigte sich in Versuchen mit NHPs, dass Favipiravir insbesondere eine Wirkung gegen das MARV entfaltet, während die Effekte auf EBOV weniger ausgeprägt waren (Bixler et al., 2018). Daten, die aus klinischen Studien während des EBOV-Ausbruchs in Westafrika gewonnen

wurden, zeigen Inkonsistenzen. Eine erste Studie konnte einen klinischen Nutzen der Favipiravir-Therapie feststellen, während dies in einer zweiten nur für Patienten mit schwacher bis mittlerer Viruslast bestätigt werden konnte (Bai et al., 2016; Sissoko et al., 2016). Eine retrospektive Studie sieht parallel zum ZMAPP zwar eine verbesserte Überlebensrate, jedoch keinen statistisch signifikanten Effekt (Kerber et al., 2019).

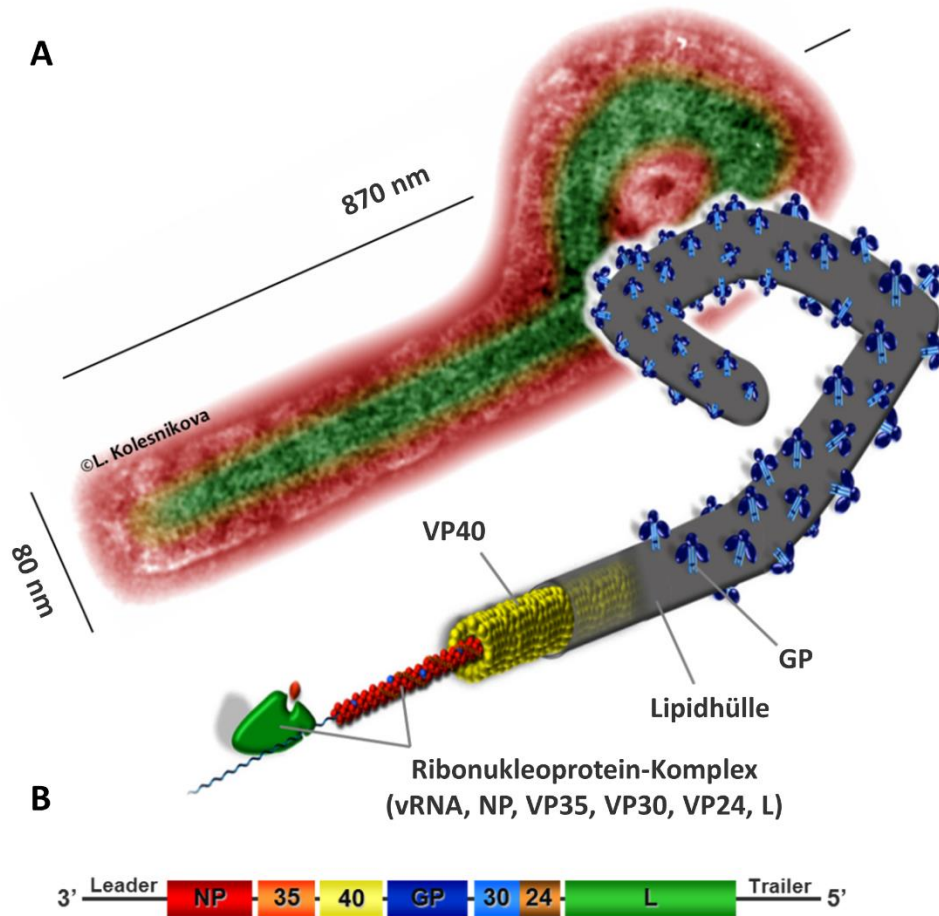
Während insbesondere die Entwicklung eines Impfstoffes gegen Filoviren sehr vielversprechend verläuft, bleiben noch viele offene Fragen, z.B. bezüglich des tatsächlichen Langzeitschutzes der Vakzinen oder beobachteter Nebenwirkungen bei der Applikation. Diese Fragen zu adressieren und dabei die bestehenden Vakzin- und Therapiekandidaten zu wirksamen Waffen im Kampf gegen EBOV und MARV weiterzuentwickeln bleibt daher auch zukünftig ein primäres Ziel der virologischen Forschung.

## 2.4 Morphologie und Genomstruktur des Marburg Virus

Die Virionen des MARV erscheinen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen als membranumhüllte Partikel mit etwa 10 nm langen „Spike“-förmigen Protrusionen, die von dem transmembranen, glykosylierten Oberflächenprotein GP gebildet werden (Bharat et al., 2011). Die Virionen weisen größtenteils die für die Familie der *Filoviridae* charakteristische filamentöse Struktur auf, die häufig zu einer an eine sechs erinnernden Form gebogen sind (Peters et al., 1971; Geisbert und Jahrling, 1995; Bharat et al., 2011). Darüber hinaus können auch sphärische Partikel detektiert werden, die eine verminderte Infektiosität besitzen und deren Anteil im Verhältnis zu den filamentösen Formen mit zunehmender Infektionszeit steigt (Welsch et al., 2010). Der Durchmesser der Virionen liegt relativ einheitlich bei ca. 78-80 nm, während die Länge stark variieren kann. Geisbert und Jahrling berichten für das MARV eine Medianlänge von 795-828 nm (Durchschnitt 869 nm), während EBOV-Partikel bei einem Median von 990-1086 nm (Durchschnitt 1215 nm) etwas länger erscheinen. Dennoch wurden in dieser Studie auch deutlich kürzere sowie deutlich längere Formen gefunden, die im Falle des EBOV teilweise bis zu 2000 nm Länge erreichten (Geisbert und Jahrling, 1995).

Auf Proteinebene setzt sich das MARV aus den sieben Strukturproteinen NP, VP35, VP40, GP, VP30, VP24 und L zusammen, die auf dem 19,1 Kilobasen umfassenden einzelsträngigen, nicht segmentierten RNA-Genom in negativer Orientierung in jeweils einem eigenen offenen Leserahmen (OLR) kodiert werden (Feldmann et al., 1992; Details in Abb. 2.3 sowie im Abschnitt 2.5). Außer im Falle der überlappenden OLR von VP30 und VP24, sind die OLR dabei in der Regel durch untranslatierte, intergenische Regionen separiert, in denen konservierte Sequenzmotive für die Initiation und Termination der Transkription lokalisiert sind (Feldmann et al., 1992; Mühlberger et al., 1996). Besonders zu erwähnen ist, dass der OLR von MARV-GP ausschließlich für das vollständige Protein

kodiert, während im Falle des EBOV eine Synthese des GP in voller Länge nur durch transkriptionelles „Gene Editing“ erreicht wird (Volchkov et al., 1995; Sanchez et al., 1996; Feldmann et al., 1999). Durch diesen Mechanismus produziert das EBOV mindestens zwei weitere Nicht-Strukturproteine auf Basis der GP-Sequenz, die vor allem immunmodulative Funktionen zu besitzen scheinen (Volchkova et al., 1998; Mehedi et al., 2011a; Volchkova et al., 2015). Die kodierenden Bereiche werden zusätzlich durch nicht translatierte 3'-Leader- bzw. 5'-Trailer-Sequenzen flankiert, die regulatorische Motive für den Replikationsstart enthalten (Feldmann et al., 1992).



**Abb. 2.3: Aufbau und Morphologie des MARV.**

(A) Oben: kolorierte elektronenmikroskopische Aufnahme eines MARV-Partikels; grün: Nukleokapsid; rot: Virushülle mit dem Oberflächenprotein GP und dem darunterliegenden Matrixprotein VP40. Unten: Schematische Darstellung der Lokalisation der sieben Strukturproteine in einem MARV-Partikel. (B) Genomstruktur des MARV. (modifiziert zur Verfügung gestellt von L. Kolesnikova und G. Schudt)

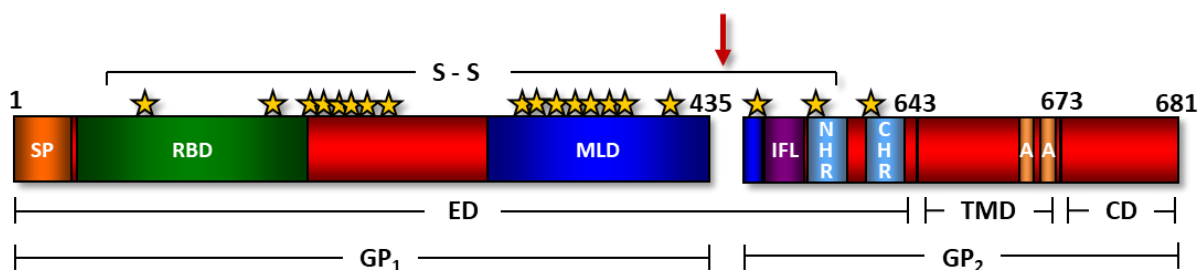
Das RNA-Genom des MARV wird durch das Nukleoprotein NP helikal enkapsidiert und dadurch stabilisiert. Das NP-enkapsidierte Genom formiert gemeinsam mit der RNA-abhängigen RNA-Polymerase L sowie den viralen Proteinen VP24, VP30 und VP35 den Ribonukleoprotein (RNP)-Komplex bzw. das Nukleokapsid (Becker et al., 1998; Bharat et al., 2011; Abb. 2.3 A). Die Innenseite der Membranhülle wird durch das Matrixprotein VP40 ausgekleidet, das die Assoziation zwischen dem

RNP-Komplex und der Lipidhülle vermittelt und zudem die filamentöse Form der Virionen determiniert (Noda et al., 2002; Swenson et al., 2004; Kolesnikova et al., 2004b; Bharat et al., 2011; Abb. 2.3 A). Das Glykoprotein GP stellt das einzige Oberflächenprotein des MARV dar und ist in homotrimerer Form in die Hüllmembran eingelagert. (Feldmann et al., 1991; Bharat et al., 2011; Abb. 2.3 A).

## 2.5 Virale Strukturproteine

**GP** Mit dem Glykoprotein GP besitzt das MARV ein einziges Oberflächenprotein, das als Homotrimer in der viralen Hüllmembran verankert ist (Feldmann et al., 1991). Das GP spielt eine essentielle Rolle im Replikationszyklus des MARV, da es mit der Adsorption der Viren an die Zielzelle, der Rezeptorbindung im späten Endosom sowie der Fusion der viralen mit der endosomalen Membran den Eintritt des Virus in die Zielzelle und die anschließende Genomfreisetzung ins Zytoplasma ermöglicht (Carette et al., 2011; Coté et al., 2011; Miller et al., 2012). Damit ist es für eine erfolgreiche Infektion unerlässlich.

Das MARV-GP besteht aus 681 AS, die strukturell in eine große N-terminale *Ektodomäne* (ED, AS 1-642), eine hydrophobe *Transmembrandomäne* (TMD, AS 643-673) sowie eine kurze, hydrophile *zytoplasmatische Domäne* am C-Terminus (CD, AS 674-681) unterteilt werden kann (Will et al., 1993; Überblick in Mittler et al., 2013). In der ED befinden sich weiterhin die *Rezeptorbindende Domäne*



**Abb. 2.4: Schematischer Aufbau von MARV-GP.**

Der prinzipielle Aufbau des MARV-GP folgt dem Muster eines typischen Typ I-Transmembranproteins und beinhaltet eine N-terminale Ektodomäne (ED, AS 1-642) mit dem bei der Translation abgespaltenen Signalpeptid am äußersten N-Terminus (SP, AS 1-33), eine Transmembrandomäne (TMD, AS 643-673) sowie eine kurze, C-terminale zytoplasmatische Domäne (CD, AS 674-681). Weitere funktionelle Regionen des GP-Proteins umfassen vom N-Term aus gesehen: die Rezeptor-bindende Domäne (RBD, AS 38-188), die stark N- und O-glykosylierte Muzin-ähnliche Domäne (MLD, AS 289-501), die interne Fusionsschleife (ILF, AS 511-552) mit den N- bzw. C-terminalen Heptadenmuster (NHR, AS 553-596 / CHR, AS 616-633) sowie zwei Acylierungsstellen (A, AS 671+673). Der rote Pfeil deutet auf die Furin-Spaltstelle an AS 435, an der das Vorläuferprotein in die über eine Disulfidbrücke (S-S) verbunden bleibenden Untereinheiten GP<sub>1</sub> und GP<sub>2</sub> gespalten wird. Goldene Sterne kennzeichnen N-Glykosylierungsstellen. Die Abbildung wurde modifiziert entnommen aus Mittler, 2009.

(RBD, AS 38-188; Kuhn et al., 2006), die stark N- und O-glykosylierte *Muzin-ähnliche Domäne* (MLD, AS 289-501; Feldmann et al., 1991; Geyer et al., 1992), die *interne Fusionsschleife* (ILF, AS 511-552; Weissenhorn et al., 1998; Koelhoeffer et al., 2012) sowie die *Oligomerisierungsdomäne* (AS 584-599; Feldmann et al., 1991). Wichtig für die Aktivität des GP als virales Klasse I-Fusionsprotein sind



außerdem die *N- und C-terminalen Heptadenmuster* (NHR/CHR) an AS 553-596 bzw. AS 616-633 (Harrison et al., 2012; Koelhoff et al., 2012). Als Typ I-Transmembranprotein besitzt das GP zudem ein *Signalpeptid* am äußersten N-Terminus (AS 1-33), das während der Translation an der Membran des rauen endoplasmatischen Retikulums (rER) abgespalten wird (Will et al., 1993). Das MARV-GP besitzt zudem zwei *Phosphorylierungsstellen* in der ED (AS 260 + 273; Sängler et al., 2002), 19 *N-* und 30 potentielle *O-Glykosylierungsstellen* (Feldmann et al., 1991; Geyer et al., 1992; Will et al., 1993), eine *Furin-Spaltstelle* innerhalb der MLD (AS 435; Volchkov et al., 2000) sowie zwei *Acylierungsstellen* am C-terminalen Ende der TMD (AS 671 + 673; Funke et al., 1995). Abb. 2.4 gibt einen schematischen Überblick über die Struktur und die wichtigsten Domänen von MARV-GP.

Während der Synthese des GP im rER erfolgt bereits die kotranslationale Addition von Mannose-reichen Glykanen (N-Glykosylierung), wodurch sich die unreife ER-Form (preGP<sub>ER</sub>) mit einem Molekulargewicht von ca. 140 kDa bildet, die sich durch eine Sensitivität gegenüber der Endoglykosidase H (Endo H) auszeichnet (Becker et al., 1996). Im Anschluss wird das GP, dem klassischen sekretorischen Transportweg folgend, in den Golgi-Apparat weitergeleitet, in dem die Mannose-reichen Glykane zu komplexen N-Glykanen modifiziert werden, wodurch sich die Endo H-resistente Form bildet (Becker et al., 1996; Bieberich, 2014). Durch die weitere Addition von O-Glykanen entsteht die reife Form des GP, die im *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) schließlich an Position 435 durch die Prohormonkonvertase Furin in die beiden Unterheiten GP<sub>1</sub> (170 kDa) und GP<sub>2</sub> (46 kDa) gespalten wird, die über eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft bleiben (Feldmann et al., 1991; Geyer et al., 1992; Will et al., 1993; Becker et al., 1996; Volchkov et al., 2000). Im Gegensatz zu vielen anderen viralen Glykoproteinen besitzt die Spaltung von GP im Golgi-Apparat durch Furin jedoch nur eine geringe Bedeutung für die Replikationskompetenz des MARV (Ströher et al., 2007).

Nach dem Verlassen des TGN wird MARV-GP über vesikulären Transport zur Plasmamembran (PM) befördert (Becker et al., 1996; Mittler et al., 2013). Dabei führt die Koexpression des Matrixproteins VP40 zu einer Redistribution von GP in VP40-reiche Clusterstrukturen an der PM und zu einer Inkorporation von GP in freigesetzte filamentöse Virus-ähnliche Partikel (VLPs) (Noda et al., 2002; Kolesnikova et al., 2004b; Swenson et al., 2004). Die Zusammenkunft von GP und VP40 wird daher als kritischer Schritt zur Bildung der viralen Hülle angesehen, bei der multivesikuläre Strukturen mit Charakteristika von späten Endosomen, sog. „multivesicular bodies“ (MVBs), beteiligt zu sein scheinen (Kolesnikova et al., 2002; 2004a; 2004b). Außerdem konnte gezeigt werden, dass der TMD des MARV-GP eine substantielle Sortierungsfunktion für die Umverteilung von GP zu den VP40-Clustern zukommt, während eine Deletion der MLD oder der CD weder das Transportverhalten noch die Inkorporation von MARV-GP in filamentöse VLPs beeinträchtigt (Manicassamy et al., 2007; Mittler et al., 2007; 2011; 2013; Mittler, Schudt, Halwe et al., 2018). Unklar bleibt jedoch, wo genau GP und VP40 erstmals

aufeinandertreffen, über welchen Mechanismus GP zu den VP40-reichen Regionen gelangt und ob weitere zelluläre Kompartimente involviert sind.

Mit Blick auf die solitäre Expression von MARV-GP konnte mithilfe der Kombination von Zytoskelett-modifizierenden Inhibitoren und konfokaler sowie Lebendzellmikroskopie aufgedeckt werden, dass MARV-GP entlang des Tubulin-Zytoskeletts transportiert wird (Mittler, Schudt, Halwe et al., 2018). Darüber hinaus ist bislang jedoch unbekannt, mit welchen subzellulären Kompartimenten und Wirtsfaktoren die Beförderung von GP zwischen dem TGN und der PM im Detail verknüpft ist. Eine Studie über die Mechanismen der Freisetzung von Filoviren legt nahe, dass sowohl MARV- als auch EBOV-GP in sog. „*Lipid Raft*“-Domänen lokalisiert ist (Bavari et al., 2002), die als dynamische Sterol- und Sphingolipid-reiche Membransubkompartimente mit spezifischer Proteinzusammensetzung definiert werden können („*dynamic nanoscale sterol, sphingolipid-enriched, ordered assemblies of specific proteins*“, Simons und Sampaio, 2011). Eine weitere Studie konnte die Assoziation von EBOV-GP und „*Lipid Rafts*“ allerdings nicht bestätigen (Lopez et al., 2012), was auch den Zusammenhang von MARV-GP und „*Lipid Rafts*“ infragestellt. Für das EBOV-GP konnten außerdem kürzlich zwei spezifische N-Glykosylierungsstellen an den Positionen N563 und N618 identifiziert werden, die essentiell sowohl für die korrekte Prozessierung und Faltung des GP während der ER/Golgi-Passage als auch für die Inkorporation in HIV-1-Pseudovirionen waren, während sich die restlichen N-Glykosylierungsstellen als entbehrlich erwiesen (Lennemann et al., 2015; Wang et al., 2017). Auch im Falle des MARV-GP konnte mithilfe einer generellen Inhibition der N-Glykosylierung durch das Nukleosid-Antibiotikum Tunicamycin gezeigt werden, dass eine korrekte N-Glykosylierung essentiell für den Transport zur Zelloberfläche ist (Becker et al., 1996). Welche AS des MARV-GP hierbei im Detail eine Rolle spielen, ist derzeit noch offen.

In polarisierten Epithelzellen ist solitär exprimiertes MARV-GP an der apikalen Membran lokalisiert, während die Freisetzung von MARV-Partikeln basolateral erfolgt (Sänger et al., 2001). Analog zu den Membranclustern in unpolarierten Zellen bewirkt auch hier die Präsenz des basolateral sortierten VP40 eine partielle Redistribution von GP von der apikalen zur basolateralen Membran als Voraussetzung der Freisetzung infektiöser, GP-haltiger Virionen (Sänger et al., 2001; Kolesnikova et al., 2007b).

Die Bedeutung des GP für den Replikationszyklus des MARV tritt insbesondere beim Eintritt in die Zielzellen zutage, da GP als einziges Oberflächenprotein des Virus an allen zentralen Schritten von der Adsorption bis zur Freisetzung der Genome ins Zytoplasma der Zelle in zentraler Rolle partizipiert. So vermittelt das stark glykosylierte GP zunächst die initiale Bindung des MARV an bestimmte Strukturen auf der Zelloberfläche und induziert so eine Ankonzentration der Viren auf der Zelle. Zu diesen GP-affinen Strukturen zählen dabei vor allem Glykan-bindende C-Typ Lektine wie *DC-SIGN* („dendritic



cellspecific ICAM-3-grabbing non-integrin“), *LSEctin* („liver and lymph node sinusoidal endothelial cell C-type lectin“), *hGML* („human macrophage galactose- and N-acetylgalactosamine-specific C-type lectin“) oder der hepatische Asialoglykoproteinrezeptor (Becker et al., 1995; Takada et al., 2004; Marzi et al., 2004; Gramberg et al., 2005; Hoffmann-Winkler et al., 2012). Zudem konnte für Epithel- und T-Zellen eine Rolle des Oberflächenproteins *TIM-1* („T-cell immunoglobulin and mucin domain 1“) gezeigt werden (Kondratowicz et al., 2011; Hoffmann-Winkler et al., 2012). Die Bindung an den spezifischen Rezeptor Niemann-Pick C1 (NPC1) erfolgt nicht an der PM, sondern intrazellulär im endolysosomalen System (Carette et al., 2011; Coté et al., 2011; Miller et al., 2012; Hunt et al., 2012). Damit das GP in der Lage ist, seinen Rezeptor zu binden, muss jedoch zunächst die RBD exponiert werden, die durch die Glykankappe und die MLD abgeschirmt ist (Lee et al., 2008; Hashiguchi et al., 2015; Bornholdt et al., 2016). Im Falle des EBOV wird das GP im azidifizierten Endosom durch die Cathepsine B und L gespalten, während für das MARV-GP eine noch unbekannte Cystein-Protease diese Aufgabe zu übernehmen scheint (Chandran et al., 2005; Gnirß et al., 2012; Misasi et al., 2012). In der Folge bindet das gespaltene GP den endosomalen Rezeptor NPC1 und initiiert mithilfe der IFL sowie den NHR und CHR die Fusion der viralen mit der endosomalen Membran, um eine Freisetzung der Nukleokapside zu ermöglichen (Carette et al., 2011; Coté et al., 2011; Miller et al., 2012; Harrison et al., 2012; Koellhoffer et al., 2012).

**VP40** Das Matrixprotein VP40 des MARV stellt ein multifunktionelles, peripheres Membranprotein dar, das in zentralen Bereichen des Replikationszyklus wie Replikation und Transkription, Assemblierung und Freisetzung oder der Partikel-Morphologie involviert ist. MARV-VP40 setzt sich aus 303 AS zusammen, die in zwei über eine flexible „Linker“-Region verbundene Domänen unterteilt werden können. Die N-terminale Domäne enthält dabei wichtige, konservierte Sequenzen für die Homo-Oligomerisierung sowie für die Interferon (IFN)-antagonistische Funktion von VP40, während in der C-terminalen Domäne umfangreiche kationische Motive für die Interaktion mit anionischen Lipiden lokalisiert sind (Valmas et al., 2010; 2011; Bornholdt et al., 2013; Oda et al., 2015; Wijesinghe und Stahelin, 2015; Wijesinghe et al., 2017). Die Funktionen von VP40 sind eng mit seinem oligomeren Status verknüpft. So wird das Protein zunächst als Monomer im Zytoplasma synthetisiert, lagert sich jedoch schnell über die N-terminale Domäne zu Schmetterlings-förmigen Dimeren zusammen, die wahrscheinlich die Transportform von VP40 darstellen (Bornholdt et al., 2013; Oda et al., 2015). Infolge einer spezifischen Interaktion des kationischen C-Terms mit anionischen Lipiden wie Phosphatidylserin (PS) an der inneren PM erfährt das Dimer eine Konformationsänderung, die zu einer engen Assoziation von VP40 mit der Lipidmembran führt. Infolgedessen oligomerisiert das VP40 zu Hexameren, die wiederum untereinander interagieren und so schließlich die sukzessive Entstehung der charakteristischen VP40-Matrix an der PM einleiten, die letztlich auch in freigesetzten Virionen

wiederzufinden ist (Bornholdt et al., 2013; Oda et al., 2015; Wijesinghe und Stahelin, 2015; Wijesinghe et al., 2017; Bhattarai et al., 2017). Für EBOV-VP40 ist zudem gezeigt, dass eine oktamere, RNA-bindende Form eine wichtige Rolle bei der Regulation von Replikation und Transkription spielt (Gomis-Rüth et al., 2003; Hoenen et al., 2005; Hoenen et al., 2010; Bornholdt et al., 2013).

In Untersuchungen zum Transport von MARV-VP40 konnte eine intrazelluläre Assoziation mit endosomalen Membranen, insbesondere MVBs mit Charakteristika von späten Endosomen, beobachtet werden, sodass eine Beförderung von VP40 über den retrograden spätendosomalen Transportweg postuliert wurde (Kolesnikova et al., 2002; 2004a; 2007a). Eine weitere Studie konnte darüber hinaus eine Bedeutung des Rab11-abhängigen Recycling Systems für den Transport und die Freisetzung von EBOV-VP40 beobachten (Nanbo und Ohba, 2018).

Auch bei der Assemblierung und Freisetzung infektiöser MARV-Partikel nimmt VP40 eine essentielle Rolle ein und seine solitäre Expression genügt zur Formation filamentöser VLPs (Noda et al., 2002; Kolesnikova et al., 2004b; Swenson et al., 2004). Um das „*Budding*“ von filamentösen Partikeln an der PM zu vermitteln, interagiert MARV-VP40 über eine sog. „*Late Domain*“ mit der AS-Sequenz PPPY mit Komponenten der zellulären ESCRT-Maschinerie (ESCRT: „*endosomal sorting complex required for transport*“), wobei insbesondere die Wirtsfaktoren Tsg101, Nedd4.1 und Vps4 eine zentrale Funktion einnehmen (Urata et al., 2007; Kolesnikova et al., 2009; Urata und Yasuda, 2010). Neben der bereits im letzten Abschnitt erwähnten Redistribution von GP zu den viralen „*Budding-Sites*“ ist das VP40 auch die treibende Kraft bei der Rekrutierung von NP bzw. Nukleokapsiden zur PM und hier insbesondere in Filopodien als die primären Orte der Partikelfreisetzung (Kolesnikova et al., 2007; Dolnik et al., 2010; Kolesnikova et al., 2012; Schudt et al., 2013). Eine spezifische Phosphorylierung von VP40 an den Tyrosinen 7, 10, 13 und 19 ist dabei essentiell für die Rekrutierung der Nukleokapside, die erst im Verbund mit VP40 eine intrafilopodiale Motilität in Richtung der Filopodien-Spitzen entwickeln, an denen schließlich die Freisetzung der Partikel stattfindet (Kolesnikova et al., 2012; Schudt et al., 2013). Diese Funktionen unterstreichen die zentrale Bedeutung von VP40 für die Assemblierung und Freisetzung des MARV.

**NP** Im ersten OLR des MARV-Genoms ist das 695 AS umfassende Nukleoprotein NP kodiert, das in seiner phosphorylierten Form die Hauptkomponente der Nukleokapside bildet (Kiley et al., 1982; 1988; Becker et al., 1994; 1998). NP induziert in transient transfizierten sowie in infizierten Zellen die Bildung von perinukleären Inklusionen („*inclusion bodies*“), die als sog. „*viral factories*“ die Orte der filoviralen Replikation darstellen (Becker et al., 1998; Mühlberger et al., 1998; Hoenen et al., 2012; Dolnik et al., 2015). Darüber hinaus können in den Inklusionen eine Vielzahl von Nukleokapsiden detektiert werden, die über einen Aktin-abhängigen Transport von den Inklusionen in die Peripherie

transportiert werden. Diese Beobachtungen sprechen deutlich dafür, dass auch die Assemblierung der RNP-Komplexe in diesen viralen Mikrokompartmenten stattfindet (Geisbert und Jahrling, 1995; Becker et al., 1998; Kolesnikova et al., 2000; Schudt et al., 2013; Dolnik et al., 2014; 2015). In einem Komplex mit der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase und dem Kofaktor VP35 dirigiert NP außerdem die virale Replikation und Transkription (Becker et al., 1998; Mühlberger et al., 1998). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von bestimmten Serin-Clustern im NP eine wichtige modulierende Funktion bei der Balancierung von Replikation und Transkription in frühen Stadien der Infektion spielt (DiCarlo et al., 2011).

Analog zu MARV-VP40 verfügt auch MARV-NP über ein „*Late Domain*“-Motiv (PSAP), durch das NP die Rekrutierung des zellulären ESCRT-Komplexes, insbesondere Tsg101, zu den viralen „*Budding-Sites*“ unterstützt. Durch diese Eigenschaft ist NP in der Lage, im Konzert mit VP40 die Freisetzung von neuen Partikeln signifikant zu erhöhen (Dolnik et al., 2010; 2014; 2015; Wenigenrath et al., 2010).

**VP30** Das zweite Protein des Nukleokapsid-Komplexes ist das 281 AS große VP30 (Bukreyev et al., 1993; Becker et al., 1998). Bei VP30 handelt es sich um ein Phosphoprotein, dessen Funktion von seinem Phosphorylierungsstatus abhängt. Das phosphorylierte VP30 interagiert mit den anderen beiden Nukleokapsidkomponenten NP und VP35 und wird in die viralen Inklusionen rekrutiert, agiert aber gleichzeitig als Repressor der viralen Transkription (Becker et al., 1998; Modrof et al., 2001; Tigabu et al., 2018). Für EBOV-VP30 ist ein Modell für die Rolle einer dynamischen (De-) Phosphorylierung von VP30 vorgeschlagen, in dem das dephosphorylierte VP30 die Transkription der viralen RNA erhöht, während das phosphorylierte VP30 diese hemmt und stattdessen eng mit den Nukleokapsiden assoziiert (Martinez et al., 2011; Biedenkopf et al., 2013; 2016; Lier et al., 2017). Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass dieses Modell generell auch für MARV-VP30 zutrifft (Tigabu et al., 2018), auch wenn im Gegensatz zum EBOV das MARV-VP30 nicht essentiell für die Transkription ist (Mühlberger et al., 1998; 1999). Für den cDNA-basierten „*Rescue*“ von rekombinantem MARV ist die Präsenz von VP30 hingegen erforderlich und seine Depletion vermindert die Expression der anderen Strukturproteine des MARV (Fowler et al., 2005; Enterlein et al., 2006).

**VP35** Das multifunktionelle Protein VP35 besitzt 329 AS und gilt trotz seines schwachen Phosphorylierungsgrads als funktionelles Äquivalent zu den Phosphoproteinen anderer Vertreter der *Mononegavirales* (Mühlberger et al., 1998). VP35 fungiert als essentieller Kofaktor der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase L, wobei diese Funktion von der Homo-Oligomerisierung des VP35 zu Trimeren abhängig ist (Mühlberger et al., 1998; 1999; Möller et al., 2005; Bruhn et al., 2017). Weiterhin ist die Interaktion von VP35 mit NP und L von zentraler Bedeutung sowohl für seine Rolle während der Replikation und Transkription als auch für seinen Einbau in die Nukleokapside (Becker et al., 1998;

Mühlberger et al., 1998). Darüber hinaus agiert VP35 als ein virales Chaperon und besitzt als IFN-Antagonist immunesvasive Funktionen (Basler und Amarasinghe, 2009; Bale et al., 2012; Liu et al., 2017).

**VP24** Mit einer Größe von 253 AS das kleinste Strukturprotein des MARV, wurde VP24 lange Zeit als zweites Matrixprotein gehandelt (Bukreyev et al., 1995; Beer et al., 1999). Jedoch konnten neuere elektronentomographische Aufnahmen aufdecken, dass VP24 eine deutliche Assoziation mit den Nukleokapsiden zeigt (Bharat et al., 2011). VP24 besitzt eine Vielzahl an hydrophoben AS, die eine Interaktion mit Lipidmembranen ermöglichen (Bukreyev et al., 1995; Bamberg et al., 2005). Außerdem interagiert VP24 mit NP und wird von diesem in die viralen Inklusionen rekrutiert (Bamberg et al., 2005). Die siRNA-vermittelte Depletion von VP24 in MARV-infizierten Zellen reduziert die Freisetzung viraler Partikel, ohne jedoch einen Einfluss auf Replikation und Transkription auszuüben (Bamberg et al., 2005). Für das EBOV-VP24 konnte mittels Lebendzellmikroskopie gezeigt werden, dass es gemeinsam mit NP und VP35 essentiell und ausreichend für den Transport Nukleokapsid-ähnlicher Strukturen ist (Takamatsu et al., 2018). Im Gegensatz zu EBOV-VP24 zeigt MARV-VP24 keine Aktivität als IFN-Antagonist (Valmas et al., 2010).

**L** Das größte Protein des MARV ist mit 2331 AS die katalytische Einheit der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase L („*Large Protein*“, Mühlberger et al., 1992). Gemeinsam mit dem Kofaktor VP35 ist L in dieser Funktion essentiell für die Replikation und Transkription des MARV (Becker et al., 1998; Mühlberger et al., 1998). Innerhalb der L-Sequenz konnten sechs konservierte Regionen identifiziert werden, die für eine enge phylogenetische Verwandtschaft der *Filoviridae* mit den *Paramyxoviridae* sprechen (Mühlberger et al., 1992). Analog zu anderen Polymerasen der *Mononegavirales* scheint dabei ein hochkonserviertes GDNQ-Motiv das katalytische Zentrum für die L-Proteine von MARV und EBOV darzustellen (Köhler et al., 2016; Schmidt und Hoenen, 2017). Als fünfte Komponente der Nukleokapsid-Komplexe ist das L-Protein intrazellulär vor allem in den viralen Inklusionen detektierbar (Becker et al., 1998).

## 2.6 Replikationszyklus des Marburg Virus

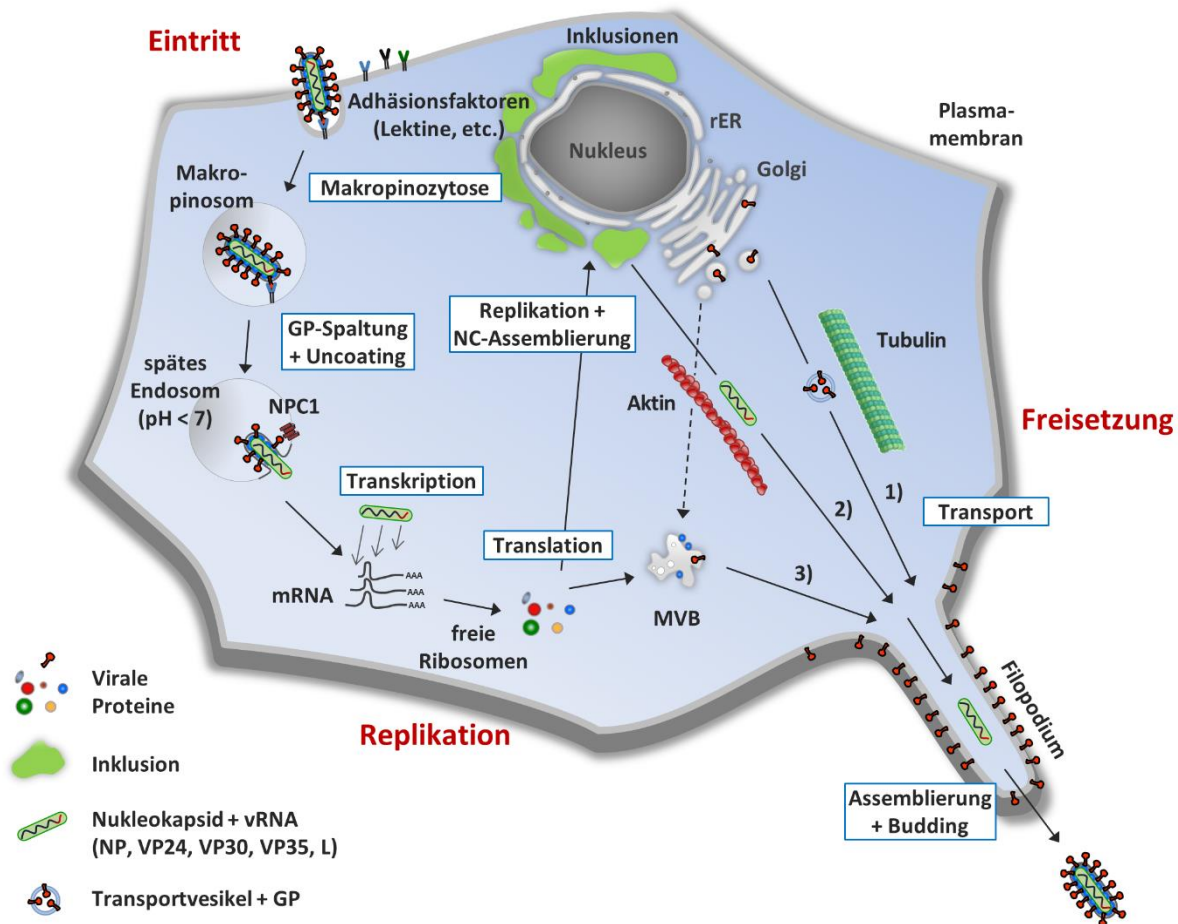
Der Replikationszyklus des MARV beginnt mit der Adsorption der Viren an seine Zielzellen. Dabei spielen, wie bereits in 2.5 erwähnt, insbesondere die Glykan-bindenden C-Typ Lektine DC-SIGN und LSECtin, hGML, der hepatische Asialoglykoproteinrezeptor sowie TIM-1 eine wichtige Rolle durch ihre Affinität zu dem stark glykosylierten GP auf der Oberfläche des MARV (Becker et al., 1995; Takada et al., 2004; Marzi et al., 2004; Gramberg et al., 2005; Kondratowicz et al., 2011; Hoffmann-Winkler et al.,

2012). Diese Faktoren sind daher wohl zumindest mitverantwortlich, dass Dendritische Zellen und Monozyten/Makrophagen, aber auch hepatische und lymphoide Epithelzellen als primäre Zielzellen des MARV fungieren (Becker et al., 1995; Feldmann et al., 1996; Bosio et al., 2003; Hoffmann-Winkler et al., 2012). Dennoch besitzen Filoviren generell einen sehr breiten Zelltropismus und können auch Zellen ohne Expression dieser Moleküle infizieren, was für weitere, bisher unbekannte Mechanismen bei der Adsorption spricht (Hoffmann-Winkler et al., 2012).

Nach der Anheftung an die Zelloberfläche nutzen Filoviren vermutlich Makropinozytose als Haupteintrittsweg in die Zelle (auch alternative Wege wie z.B. eine Clathrin-abhängige Endozytose scheinen jedoch möglich) und gelangen vom Makropinosom in frühe bzw. späte Endosomen (Saeed et al., 2010; Nanbo et al., 2010; Aleksandrowicz et al., 2011). Auch wenn dieser Prozess bisher nur für das EBOV im Detail untersucht ist, spricht die Wirksamkeit von spezifischen Makropinozytose-Inhibitoren gegen sowohl EBOV als auch MARV dafür, dass die Nutzung dieses Mechanismus eine generelle Eigenschaft von Filoviren ist (Anantpadma et al., 2016). Im azidifizierten Endosom wird das MARV-GP schließlich durch eine bisher unbekannte Cystein-Protease gespalten, wodurch die RBD exponiert wird und an den endolysosomalen Rezeptor NPC1 binden kann (Carette et al., 2011; Coté et al., 2011; Miller et al., 2012; Gnirß et al., 2012; Misasi et al., 2012). Auch die Fusion der viralen mit der endosomalen Membran wird durch das virale Klasse I-Fusionsprotein GP vermittelt, dessen Funktionsweise voraussichtlich dem gut beschriebenen Mechanismus des gp41 des Humanen Immundefizienzvirus 1 (HIV-1) ähnelt (Harrison et al., 2012). In diesem Modell taucht im Anschluss an die Rezeptorbindung die IFL des GP in die endosomale Membran ein und führt zu einer Konformationsänderung, die wiederum die NHR und CHR des GP exponiert. Infolgedessen falten sich die  $\alpha$ -Helix-Bündel der NHR und CHR und bringen so die virale und die endosomale Membran in unmittelbare Nähe zueinander. In der Folge verschmelzen beide Membranen und das virale Genom kann ins Zytoplasma freigesetzt werden (Colman und Lawrence, 2003; Harrison et al., 2012; Koellhoffer et al., 2012).

Im Anschluss an das „*Uncoating*“ erfolgt im Zytoplasma der Zelle die Primärtranskription durch den viralen Polymerase-Komplex bestehend aus L, VP35 und NP (Mühlberger et al., 1998). Die viralen „*messenger RNAs*“ (mRNAs) werden polyadenyliert, aber nicht enkapsidiert, und weisen bezüglich ihrer Menge einen Gradienten auf, bei dem NP als erster OLR am häufigsten und L als letzter OLR am geringsten transkribiert wird (Feldmann et al., 1992; Mühlberger, 2007). Mit Ausnahme des Typ I-Transmembranproteins GP, das kotranslational an die Membran des rER transloziert wird, werden die sechs weiteren viralen Strukturproteine an freien Ribosomen im Zytoplasma synthetisiert (Feldmann et al., 1992; Will et al., 1993). Die Präsenz von MARV-NP führt zur Bildung der charakteristischen perinukleären Inklusionen, den Orten der viralen Replikation (Becker et al., 1998; Mühlberger et al., 1998; Hoenen et al., 2012; Dolnik et al., 2015). Analog zu anderen Viren der Ordnung *Mononegavirales* wird die negativ orientierte virale RNA dabei zunächst in ein antigenomisches Komplement mit

positiver Polarität umgeschrieben, das anschließend als Matrize für die Synthese einer wiederum negativ orientierten Genomkopie fungiert, die enkapsidiert als Teil der Nukleokapside letztlich in neue Viruspartikel eingebaut wird (Mühlberger, 2007; Curran und Kolakofsky, 2008).



**Abb. 2.5: Replikationszyklus des MARV.**

Der erste Kontakt des MARV mit der Zielzelle erfolgt über eine unspezifische Adhäsion des viralen Oberflächenproteins GP mit affinen Strukturen auf der Zelloberfläche wie Glykan-bindenden C-Typ Lektinen (Eintritt). Nach dieser initialen Bindung wird das MARV vermutlich über Makropinozytose in die Zelle aufgenommen und gelangt über ein Makropinosom bzw. frühe Endosomen in ein azidifiziertes, spätes Endosom. An diesem Ort wird das GP durch bisher unbekannte Cystein-Proteasen gespalten, was zu einer Exposition der RBD und der anschließenden Bindung des endosomalen Rezeptors NPC1 führt. Die Rezeptorbindung initiiert die Fusion der viralen mit der endosomalen Membran als Voraussetzung für die Entlassung der Nukleokapside ins Zytoplasma (GP-Spaltung und Uncoating). Die viralen Genome werden im Anschluss durch den eigenen Polymerase-Komplex in mRNA umgeschrieben (Transkription). Mit Ausnahme von GP, das als Transmembranprotein in die Membran des rER synthetisiert wird, findet die Translation der viralen Proteine an freien Ribosomen im Zytoplasma statt (Translation). Nach der Synthese einer ausreichenden Menge viraler Proteine formieren sich die charakteristischen, perinukleären Inklusionen, in denen die Replikation der viralen Genome sowie die Assemblierung neuer Nukleokapside lokalisiert ist (Replikation und NC-Assemblierung). Der Transport der viralen Komponenten zu den Budding-Sites an der PM verläuft über mindestens drei separate Routen: 1) das Oberflächenprotein GP folgt dem sekretorischen Pfad bestehend aus dem ER, dem Golgi-Apparat sowie Mikrotubuli-abhängigen Transportvesikeln 2) die Nukleokapside werden über das Aktin-Zytoskelett transportiert 3) das Matrixprotein VP40 assoziiert mit endosomalen Membranen/MVBs und nutzt einen retrograden spätendosomalen Transportweg zur PM. Im endosomalen Kompartiment kann es zudem bereits zu einer Zusammenkunft von GP und VP40 kommen (gestrichelter Pfeil). An der PM oligomerisiert das VP40 zu einer dichten Matrix und rekrutiert sowohl GP als auch die Nukleokapside in Filopodien, von deren Spitzen schließlich naszierende Viruspartikel abknospen (Assemblierung und Budding). RBD: Rezeptorbindende Domäne; NPC1: Niemann-Pick C1; NC: Nukleokapsid; PM: Plasmamembran; MVB: Multivesikulärer Körper. Die Abbildung wurde modifiziert entnommen aus Schudt, 2013.



Stehen genügend Genome und Proteine zur Verfügung, assemblieren die fünf RNP-Komponenten NP, L, VP35, VP30 und VP24 vermutlich ebenfalls in den perinukleären Inklusionen zu reifen Nukleokapsiden, die Aktin-abhängig in die Zellperipherie transportiert werden (Becker et al., 1998; Kolesnikova et al., 2000; Schudt et al., 2013; Dolnik et al., 2014; 2015). Separiert von den Nukleokapsiden wird MARV-GP über den sekretorischen Pfad zur PM transportiert und erfährt dabei während der ER-/Golgi-Passage eine Vielzahl von Modifikationen, insbesondere N- und O-Glykosylierungen (Becker et al., 1996). Das Matrixprotein VP40 assoziiert zwar partiell auch mit den Inklusionen und perinukleären Nukleokapsiden, folgt jedoch primär einem eigenen Transportweg zur PM, in dem u.a. endosomale Membranen, vor allem MVBs, involviert sind (Kolesnikova et al., 2002; 2004a; 2009; Schudt et al., 2013). An der PM führt die Interaktion von VP40 mit der Lipidmembran zu der Bildung einer dichten Matrix aus VP40-Hexameren (Bornholdt et al., 2013; Oda et al., 2015; Wijesinghe und Stahelin, 2015; Wijesinghe et al., 2017; Bhattarai et al., 2017). Das peripher membran-assoziierte VP40 orchestriert dabei die Rekrutierung sowohl von GP und Nukleokapsiden als auch von Komponenten des zellulären ESCRT-Komplexes zu den viralen „*Budding-Sites*“ (Kolesnikova et al., 2004b; 2009; 2012; Dolnik et al., 2010; 2014; 2015; Urata et al., 2007; Urata und Yasuda, 2010; Schudt et al., 2013; Mittler et al., 2013). Nach der Umhüllung der Nukleokapside mit GP- und VP40-angereicherten Membranen findet die Knospung des MARV schließlich in unpolarierten Zellen an den Enden von Filopodien über die gesamte PM verteilt statt, während neue Viruspartikel in polarisierten Zellen von der basolateralen Membran freigesetzt werden (Sänger et al., 2001; Kolesnikova et al., 2007a; 2007b).

## 2.7 Virale Strategien zur Instrumentalisierung des intrazellulären Transportsystems der Wirtszelle

Als obligat intrazelluläre Parasiten mit eingeschränktem Proteom sind Viren für ihre Replikation auf eine Vielzahl unterschiedlicher Komponenten der Wirtszelle angewiesen. Ein bekanntes Beispiel ist die Nutzung der wirtseigenen Translationsmaschinerie, insbesondere der Ribosomen, für die Synthese viraler Proteine (Walsh et al., 2013). Um die Funktionalität der neuen Virionen zu gewährleisten, müssen Viren nach der Synthese ihrer Proteine und Genomkopien sicherstellen, dass die einzelnen Komponenten zu den korrekten Destinationen in der Wirtszelle gelangen, um dort zu neuen Partikeln zu assemblieren. Dazu instrumentalisieren Viren in unterschiedlicher Weise das zelleigene intrazelluläre Transportsystem, wobei zentrale Elemente wie das Aktin- bzw. Tubulin-Zytoskelett, das ER-/Golgi-System und diverse endosomale Kompartimente zu den am häufigsten genutzten Strukturen zählen (Robinson et al., 2018). In den nächsten beiden Abschnitten soll daher ein kurzer Überblick über die wichtigsten von Viren genutzten zellulären Transportstrukturen gegeben werden. Der Übersicht

halber soll der Fokus hier auf Transportwegen liegen, die an der Assemblierung und Freisetzung von Viren beteiligt sind.

### 2.7.1 Interaktionen zwischen Viren und dem Zytoskelett

Essentiell sowohl für die generelle Aufrechterhaltung der Zellstruktur als auch für den speziellen intrazellulären Transport von Cargomolekülen ist das zelleigene Aktin- bzw. Tubulin-basierte Zytoskelett. Insbesondere Mikrotubuli (MT) werden dabei von Viren für einen schnellen Transport über lange Distanzen genutzt (Döhner et al., 2005; Radtke et al., 2006; Naghavi et al., 2017). MT setzen sich molekular aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin-Heterodimeren zusammen, die ausgehend vom perinukleären Mikrotubuli-organisierenden Zentrum (MTOC) zylindrische, polarisierte Filamente bilden, deren Plus-Enden in Richtung der PM zeigen und dynamisch (de-) polymerisieren (Radtke et al., 2006). Um den Transport von Cargo zu vermitteln, interagieren MT mit spezifischen Motorproteinen: a) Kinesine, die den Transport zum Plus-Ende (MTOC  $\rightarrow$  PM) vermitteln sowie b) Dyneine, die Bewegungen in die entgegengesetzte Richtung steuern (PM  $\rightarrow$  MTOC) (Döhner et al., 2005; Radtke et al., 2006; Naghavi et al., 2017). Viren nutzen das MT-Zytoskelett im Rahmen ihrer Assemblierung und Freisetzung vor allem in Richtung der PM, also in Kombination mit den Kinesin-Motoren. So konnte etwa gezeigt werden, dass das Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) MT stabilisiert und so einen Transport assemblierter Partikel zur PM fördert (Naghavi et al., 2013; 2017). Auch für RNA-Viren wie das Influenza A-Virus (IAV) und HIV-1 konnte ein MT-abhängiger Transport der RNP-Komplexe (IAV, HIV-1) sowie eine MT- und KIF4-vermittelte Beförderung des *gag*-Proteins von HIV-1 zur PM im Vorfeld der Assemblierung und Freisetzung gezeigt werden (Tang et al., 1999; Momose et al., 2007; Leblanc et al., 2008; Martinez et al., 2008; Nishi et al., 2009; Amorim et al., 2011). Darüber hinaus nutzen auch virale Glykoproteine wie das Hämagglutinin (HA) des IAV, das E-Protein des Westnil-Virus (WNV) oder das VSV-G MT, um zur apikalen bzw. basolateralen Membran polarisierter Zellen zu gelangen (Lafont et al., 1994; Chu und Ng, 2002). Zusätzlich konnte kürzlich ein Tubulin-abhängiger Mechanismus für den Transport von MARV-GP aufgedeckt werden (Mittler, Schudt, Halwe et al., 2018).

Neben dem Tubulin-Zytoskelett nutzen Viren ebenfalls das Aktin-Zytoskelett und Aktin-assoziierte Regulatoren und Motorproteine wie z.B. Myosine. Das Aktin-Zytoskelett basiert auf monomeren Aktin-Molekülen, die sich zu polarisierten Filamenten und Aktin-Bündeln zusammenlagern, deren Plus-Ende wie bei den MT in Richtung der PM zeigt (Radtke et al., 2006). Zusätzlich bildet Aktin ein dichtes, dreidimensionales Netzwerk unterhalb der PM, den sog. Aktin-Kortex (Radtke et al., 2006). Für die Nukleokapside der Filoviren MARV und EBOV konnte ein Transport über Aktin gezeigt werden, der in Filopodien abhängig von Myosin10 ist (Schudt et al., 2013; 2015). Weiterhin konnte eine Beförderung der Nukleokapside sowie des M-Proteins von Masernviren (MeV) über Aktin-Filamente wie auch eine wichtige Rolle von Aktin bei der Virusfreisetzung des WNV, HIV-1 und MeV beobachtet werden (Chu



et al., 2003; Dietzel et al., 2013; Wen et al., 2014). Darüber hinaus kann Aktin in einer Vielzahl von Viruspartikeln detektiert werden (Radtke et al., 2006).

### 2.7.2 Der sekretorische Pfad im viralen Replikationszyklus

Insbesondere virale Transmembranproteine, die als Oberflächenproteine oft essentielle Funktionen im viralen Replikationszyklus besitzen, sind auf einen Transit durch den sekretorischen Pfad angewiesen, in dem das ER und der Golgi-Apparat die Hauptkomponenten bilden. Wie zelluläre Transmembranproteine werden auch ihre viralen Analoga kotranslational an das rER rekrutiert und durch die ER-Membran in das Lumen des rER transloziert (Inoue und Tsai, 2013). Viele dieser Proteine folgen anschließend einer anterograden Route in Richtung des Golgi-Apparats, die u.a. von dem Hüllprotein COPII („coat protein complex II“) und der kleinen GTPase Rab1 reguliert wird (Gomez-Navarro und Miller, 2016; Robinson et al., 2018). Eine direkte Nutzung von COPII-Vesikeln ist detailliert für das VSV-G beschrieben, während eine Abhängigkeit von Rab1 neben VSV-G auch für das *env*-Protein von HIV-1 sowie für den Transport von Virionen des umhüllten Hepatitis C-Virus (HCV) gezeigt ist (Tisdale et al., 1992; Aridor et al., 1995; Pepperkok et al., 1998; Nachmias et al., 2012; Takacs et al., 2017). Andere Viren wie z.B. Coronaviren, deren Assemblierung und „*Budding*“ nicht an der PM, sondern im ERGIC („ER-Golgi intermediate compartment“) stattfindet, nutzen die retrograde COPI-abhängige Maschinerie und ein spezifisches Di-Lysin-Motiv im Spike-Oberflächenprotein, um dessen Retention an den „*Budding-Sites*“ im ERGIC zu gewährleisten (Lontok et al., 2004).

Da der Großteil der viralen Oberflächenproteine glykosyliert ist, stellt der Transit des ER-/Golgi-Systems auch im Hinblick auf die Struktur dieser Proteine einen wichtigen, wenn nicht essentiellen Schritt dar. Durch die Addition von zunächst Mannose-reichen N-Glykanen im ER und ihre anschließende Modifikation zu komplexen N-Glykanen im Golgi-Apparat, reifen die viralen Glykoproteine zu ihren funktionell aktiven Formen (Vigerust und Shepherd, 2007). Die N-Glykosylierung besitzt eine weitreichende Bedeutung für die Funktion der Glykoproteine, da sie bspw. eine korrekte Faltung sicherstellt (HIV-*env*, HCV-E1 + -E2, IAV-HA; E-Protein des Japanische Enzephalitis Virus [JEV-E]) und eine wichtige Voraussetzung für den weitergehenden intrazellulären Transport sowie die Inkorporation in neue Partikel darstellen kann (IAV-HA, MARV-GP, EBOV-GP) (Roberts et al., 1993; Becker et al., 1996; Meunier et al., 1999; Lad et al., 2000; Land und Braakman, 2001; Daniels et al., 2003; Slater-Handshy et al., 2004; Wang et al., 2017). Einige virale Glykoproteine werden weiterhin O-glykosyliert, was vermutlich hauptsächlich der Abschirmung essentieller Domänen vor dem Immunsystem dient (MARV, EBOV), aber auch eine weiterreichende Bedeutung für zentrale Funktionen wie die Fusionsaktivität oder die Partikelinkorporation haben kann (NiV, HeV) (Lee et al., 2008; Hashiguchi et al., 2015; Bornholdt et al., 2016; Stone et al., 2016).

Darüber hinaus scheinen einige Viren Bestandteile des ER-/Golgi-Systems für den weitergehenden Transport zur PM zu nutzen. So binden die Glykoproteine von Arenaviren, Hantaviren, Coronaviren, Orthomyxoviren und Filoviren ERGIC-53 („*ERGIC 53 kDa protein*“), einem funktionell mit COPII-Vesikeln verbundenen Cargo-Rezeptor, der scheinbar für die Produktion infektiöser Partikel benötigt wird (Klaus et al., 2013). Weiterhin nutzen die Matrixproteine sowohl von EBOV als auch MARV einen COPII-abhängigen Transport, der nicht im Golgi-Apparat, sondern an der PM endet (Yamayoshi et al., 2008). Die detaillierte Bedeutung dieser beiden Mechanismen ist bisher nicht eindeutig geklärt.

### 2.7.3 Sortierung im *trans*-Golgi-Netzwerk und *post*-Golgi-Transport

Der überwiegende Teil der neueren zellbiologischen Literatur zum intrazellulären Transport befasst sich mit der Sortierung und dem *post*-Golgi-Transport von Proteinen in polarisierten Zellen, die durch die Ausbildung von zwei distinkten Membrandomänen, der apikalen bzw. der basolateralen Membran, charakterisiert sind, die jeweils eine spezifische Komposition von Proteinen und Lipiden besitzen (Ellis et al., 2006; Ang und Fölsch, 2012). Zwar zeigen sich einige Unterschiede der Transportsysteme polarisierter und unpolarisierter Zellen (s. z.B. Unterteilung des Recycling Endosoms in 2.7.4), doch scheinen grundsätzliche Gemeinsamkeiten zu bestehen, z.B. die Rolle des TGN als primäre Sortierungsstation für den *post*-Golgi-Verkehr oder auch eine zumindest partielle und auf spezifischen Signalmotiven beruhenden Separation des Transports von unterschiedlichem Cargo (Mellmann et al., 1993; Müsch et al., 1996; Yoshimori et al., 1996; Keller et al., 2001; Tuma et al., 2002; Ellis et al., 2006).

Virale Pathogene sind in der Lage, die spezifischen Sortierungsmechanismen der Zelle zu kapern, indem sie die zelleigenen Sortierungssignale imitieren, die von der zellulären Transportmaschinerie erkannt und befördert werden. So befinden sich beispielsweise in der TMD des MARV-GP, des IAV-HA sowie des NB-Glykoproteins des Influenza B-Virus (IBV) wichtige Informationen zum Transport der Proteine, die u.a. die Lokalisation in Lipid Rafts als Teil des apikalen Transportwegs determinieren (Scheiffele et al., 1997; Lin et al., 1998; Mittler et al., 2007; Engel et al., 2012). Im Falle des IAV-HA konnte außerdem ein Transit des apikalen frühen Endosoms (AEE) beobachtet werden (Cresawn et al., 2007). Andere virale Glykoproteine wie EBOV-GP, Gn und Gc des Bunyamwera-Virus (BUNV) oder die L-, M- und S-Proteine des Hepatitis B-Virus (HBV) besitzen spezifische N-Glykane, um ihren Transport zu vermitteln (Lu et al., 1997; Shi et al., 2005; Wang et al., 2017). Es wird davon ausgegangen, dass der apikale N-Glykan-abhängige Pfad über eine Interaktion mit zellulären Glykan-Rezeptoren (z.B. Lektinen wie dem Galectin-3 oder VIP36) vermittelt wird (Delacour et al., 2003; 2007; Hara-Kuge et al., 2004). Auch bei basolateral sortierten viralen Proteine wie z.B. VSV-G und MeV-H und MeV-F konnten basolaterale, Tyrosin-basierte Signale in der zytoplasmatischen Domäne identifiziert werden (Thomas et al., 1993; Moll et al., 2001). Diese basolateralen Motive interagieren in der Zelle mit sog.

Adaptorproteinen, die im TGN (AP-1A, AP-2, AP-3, AP-4) oder im Recycling Endosom (RE; AP-1B) lokalisiert sind und eine Schlüsselrolle bei der Regulation des basolateralen Transportsystems einnehmen (Ang und Fölsch, 2012).

Einige andere Viren haben darüber hinaus weitere, zum Teil unkonventionelle Methoden entwickelt, um an ihren Zielort in der Zelle zu gelangen. Das HCV bspw. assembliert an „*Lipid Droplets*“, kleinen lipidreichen Vesikeln zur Fettspeicherung in der Zelle, und bildet anschließend mit dem von diesem Kompartiment stammenden „*Very Low Density Lipoprotein*“ (VLDL) sog. Lipoviropartikel, die über den VLDL-Sekretionsweg die Zelle verlassen (Herker und Ott, 2012).

In der jüngeren Forschung mehren sich zudem Berichte über die Beteiligung von endosomalen Kompartimenten, insbesondere des RE, am Transport von zellulären und viralen Proteinen. Aufgrund der primären Bedeutung dieses Kompartiments für die vorliegende Arbeit, ist diesem intrazellulären System ein eigener Absatz gewidmet.

#### **2.7.4 Die Bedeutung des endosomalen Recycling Systems für den Transport viraler Komponenten**

Bis vor einigen Jahren wurde das endosomale Recycling-System vor allem als Teil des endozytotischen Netzwerks betrachtet, über das internalisierter Cargo über einen langsamen Recycling-Weg (im Gegensatz zum schnellen Recycling über ausschließlich frühe Endosomen) zurück zur PM transportiert wird (Ellis et al., 2006). Die neuere Forschung lässt jedoch auf eine deutlich weitergehende Bedeutung dieses Kompartiments schließen, das auch für *de novo*-synthetisierte Proteine als Sortierungsstation und Transport-Intermediat zwischen dem Golgi-Apparat und der PM fungiert (Ang et al., 2004; Ellis et al., 2006; Ang und Fölsch, 2012; Goldenring, 2015). Das endosomale Recycling-System ist ein dynamisches Netzwerk aus tubulären und vesikulären Strukturen, das in polarisierten Zellen in das apikale Rab11-positive apikale Recycling Endosom (ARE) und ein Rab11-negatives „*Common Recycling Endosome*“ (CRE) unterteilt wird, das vor allem für die Sortierung basolateraler Proteine eine Rolle spielt (Weisz und Rodriguez-Boulan, 2009; Ang und Fölsch, 2012). Die Schlüsselregulatoren dieses zellulären Kompartiments sind die kleinen GTPasen Rab11 und Rab8, deren Funktionen teilweise überlappen und teilweise distinkt voneinander verlaufen (Ullrich et al., 1996; Ang et al., 2003; Goldenring, 2015). So zeigen Rab11 und Rab8 eine partielle Kolokalisation in Vesikeln, eine Interaktion mit den gleichen Effektoren (z.B. Myosin Vb, Rab11) und sind Teil einer Rab11-Rab8-Aktivierungskaskade bei der Ziliogenese (Hattula et al., 2006; Knödler et al., 2010; Roland et al., 2011). Dennoch lokalisiert Rab8 auch in Rab11-negativen tubulären Strukturen und interagiert dort mit spezifischen Effektoren wie EHD1 („*Eps 15 homology domain containing protein 1*“) und die Interaktion von Rab8 und Myosin Vb scheint an einem zu Rab11 distinkten Transportweg beteiligt zu sein (Roland

et al., 2007; 2011). Das hier bereits genannte Myosin Vb ist ein weiterer Schlüsselfaktor des endosomalen Recycling-Systems, das in polarisierten Zellen am ARE lokalisiert ist und dort, orchestriert von Rab11 bzw. Rab8, den Transport von RE zur PM vermittelt (Lapierre et al., 2001, Wang et al., 2008; Roland et al., 2011; Goldenring, 2015). Myosin Vb operiert parallel zu seinem Paralog Myosin Va vermutlich primär an der Schnittstelle zwischen dem Tubulin-Zytoskelett und dem Aktin-Kortex. In dieser Funktion bindet es Vesikel, die über MT in die Peripherie transportiert wurden, am Aktin-Kortex, um sie so in der äußersten Peripherie zu arretieren und weiter in Richtung der PM zu transportieren (Desnos et al., 2007; Provance et al., 2008; Kapitein et al., 2013).

Viren haben eine Reihe unterschiedlicher Strategien entwickelt, um sich das zelluläre Recycling-System zunutze zu machen (Überblick in Vale-Costa und Amorim, 2016). Einige Vertreter der *Paramyxoviridae* wie das MeV und das Mumpsvirus (MuV) sowie das Orthomyxovirus IAV koppeln ihre Nukleokapside an Rab11-positive RE, um ihren Transport in die Peripherie zu vermitteln (Amorim et al., 2011; Momose et al., 2011; Eisfeld et al., 2011; Chou et al., 2013; Nakatsu et al., 2013; Katoh et al., 2015). Retroviren wie HIV-1 und das Mason-Pfizer Affenvirus (M-PMV) nutzen die Re-Endozytose ihres Oberflächenproteins *env*, um es anschließend über das endosomale Recycling-System zu den mit dem Matrixprotein *gag* angereicherten „*Budding-Sites*“ an der PM zu befördern (Sfakianos und Hunter, 2003; Kirschman et al., 2018). Einen ähnlichen Mechanismus nutzt das NiV für die Re-Endozytose des Fusionsproteins F, das im Rab11-positiven RE proteolytisch aktiviert wird (Diederich et al., 2012; Weis und Maisner, 2015). Für die *Filoviridae* konnte zudem kürzlich eine funktionelle Bedeutung des Rab11-Recycling-System für den Transport des Matrixproteins VP40 sowie die Freisetzung von VLPs an der PM gezeigt werden (Nanbo und Ohba, 2018). Für das VSV-G hingegen ist ein Transport über das CRE in einem Rab8- und Rab13-abhängigen Prozess beobachtet worden (Ang et al., 2003; 2004; Henry und Sheff, 2008; Nokes et al., 2008; Ang und Fölsch, 2012). Rab8B ist außerdem im Transport von WNV-Partikeln vom RE zur PM involviert, während für die Freisetzung des Andenvirus sowohl Rab8 als auch Rab11 bedeutend sind (Rowe et al., 2008; Kobayashi et al., 2016).

Eine Rolle von Myosin Vb konnte z.B. für das Respiratorische Synzytialvirus (RSV) gezeigt werden, dessen Freisetzung von der apikalen Membran bei der Überexpression einer dominant-negativen (DN) Myosin Vb-Mutante blockiert und stattdessen zur basolateralen Seite umgeleitet wurde (Brock et al., 2003). Auch der RNP-Transport des humanen Parainfluenza Virus 1 (hPIV1) sowie des Sendaivirus (SeV) wurde durch das DN Myosin Vb blockiert (Stone et al., 2016). Außerdem führte die Expression von DN Myosin Vb wie auch von DN Rab11 zu einer intrazellulären Akkumulation des vpu-Proteins von HIV-1, was in einer reduzierten Partikelfreisetzung resultierte (Varthakavi et al., 2006).

Das endosomale Recycling-System ist ein dynamisches Netzwerk aus tubulären und vesikulären Strukturen, das sowohl mit biosynthetischen als auch mit endozytotischen Transportrouten in der Zelle verknüpft ist. Viren haben unterschiedliche

## 2.8 Fragestellung

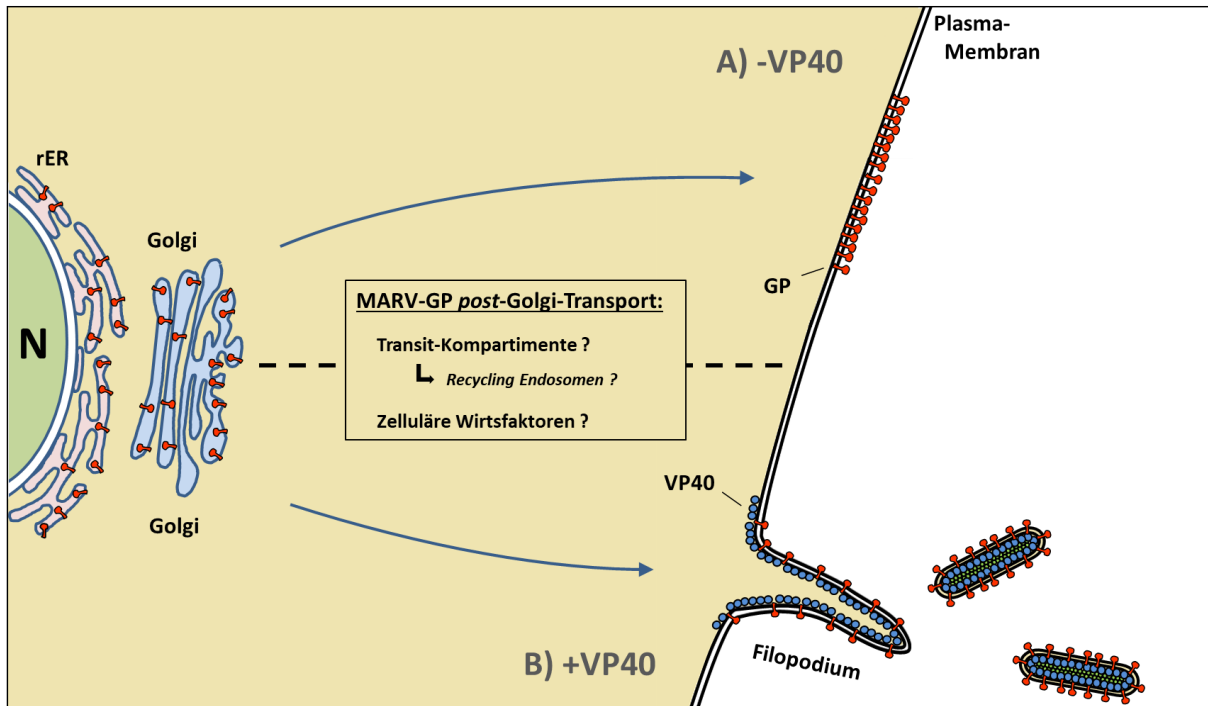
Das Glykoprotein GP stellt das einzige Oberflächenprotein des MARV dar und besitzt daher essentielle Schlüsselfunktionen für den Infektionszyklus des Virus, wie z.B. die Vermittlung des Eintritts in Zielzellen (s. 2.5 und 2.6). Eine wesentliche Voraussetzung für die Erfüllung dieser Funktionen ist ein korrekter Transport des GP zu den viralen „*Budding-sites*“ an der PM sowie die anschließende Inkorporation in neue Viruspartikel. Trotz der substantiellen Bedeutung im Infektionszyklus des MARV ist der aktuelle Kenntnisstand bezüglich des Transports des neu synthetisierten GP limitiert.

Basierend auf früheren Studien ist bekannt, dass GP als Typ-I-Transmembranprotein im rER synthetisiert wird und anschließend dem klassischen sekretorischen Pfad über den Golgi-Apparat folgt (Becker et al., 1996; Volchkov et al., 2000). Anhand von Studien in polarisierten Zellen konnte zudem gezeigt werden, dass MARV-GP an die apikale Membran sortiert wird (Sänger et al., 2001). In Anwesenheit des Matrixproteins VP40 erfährt das GP eine Umverteilung in periphere VP40-Cluster (unpolarisierte Zellen) bzw. an die basolaterale Membran (polarisierte Zellen), ein essentieller Schritt zur Inkorporation von GP in neue, infektiöse Partikel (Kolesnikova et al., 2004b; 2007b; Swenson et al., 2004; Mittler et al., 2007; 2013). Dennoch ist weitgehend unbekannt, welche spezifischen subzellulären Kompartimente MARV-GP zwischen dem Golgi-Apparat und der PM durchschreitet, welche zellulären Wirtsfaktoren an diesem Transport beteiligt sind und welche Bedeutung diese Mechanismen bei der Rekrutierung des GP zu viralen VP40-reichen „*Budding-Sites*“ besitzt. Zwar wurde eine Assoziation von MARV-GP und EBOV-GP mit *Lipid Rafts* postuliert, diese konnte jedoch für das EBOV-GP in einer neueren Studie nicht bestätigt werden, was auch die Ergebnisse für MARV-GP zumindest in Zweifel zieht (Bavari et al., 2002; Lopez et al., 2012).

Das Ziel dieser Arbeit bestand daher darin, den *post-Golgi*-Transport von MARV-GP näher zu charakterisieren und dabei subzelluläre Kompartimente und Wirtsfaktoren zu identifizieren, die eine wichtige funktionelle Bedeutung für die Beförderung von MARV-GP zur PM bzw. zu den VP40-reichen „*Budding-Sites*“ besitzen.

Erste Untersuchungen im Zuge meiner Bachelor- und Masterarbeit (Halwe, 2012; Halwe, 2014) deuteten darauf hin, dass die intrazellulären Lokalisationen von MARV-GP sowie MARV-VP40 teilweise mit den kleinen GTPasen Rab8 und Rab11 assoziiert sind, die als Regulatoren des Transports von Recycling Endosomen beschrieben sind (Ullrich et al., 1996; Ang et al., 2003). Wie bereits in 2.7.4 dargelegt, mehren sich in den letzten Jahren die Hinweise, dass RE eine bedeutende Rolle als intermediäres Kompartiment für den Transport viraler Proteine zur PM einnimmt. Für das nah verwandte EBOV konnte zudem kürzlich eine Bedeutung des Rab11-assoziierten Recycling-Systems für den Transport von VP40 und die Partikelfreisetzung nachgewiesen werden (Nanbo und Ohba, 2018). Diese Ergebnisse bilden daher die Grundlage für die Ausgangshypothese, dass MARV-GP nach dem

Verlassen des Golgi-Apparats das endosomale Recycling-System nutzt, um seinen Transport zur PM bzw. zu den viralen „*Budding-sites*“ zu vermitteln. Abb. 3.1 fasst das Ausgangs-Arbeitsmodell und die Fragestellungen dieser Arbeit noch einmal bildlich zusammen.



**Abb. 2.7:** Arbeitsmodell des intrazellulären Transports von MARV-GP und Fragestellung der Arbeit.

MARV-GP wird als Typ I-Transmembranprotein im rER synthetisiert und über den klassischen sekretorischen Transportweg weiter zum Golgi-Apparat transportiert. Unbekannt ist, welche Kompartimente und Wirtsfaktoren den *post-Golgi*-Transport von MARV-GP zur PM (A) bzw. in Anwesenheit des Matrixproteins VP40 zu den VP40-reichen viralen „*Budding-Sites*“ (B) vermitteln. Das Ziel dieser Arbeit ist daher die nähere Charakterisierung des *post-Golgi*-Transports von MARV-GP mit besonderem Fokus auf einer potentiellen Rolle des endosomalen Recycling-Systems. N: Nukleus; rER: raues endoplasmatisches Retikulum.



### 3 Material

#### 3.1 Chemikalien

##### **Agarose PeqGold universal**

Ampicillin

Ammoniumpersulfat (APS)

##### **Bacto™-Agar**

Bovines Serum-Albumin (BSA)

Bromphenolblau

##### **Calciumchlorid (CaCl<sub>2</sub>)**

Carboxymethylcellulosen (CMC)

Caseinhydrolysat

Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets

##### **1,4 Diazabicyclo-[2.2.2]-octan (DABCO)**

4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)

DNA-Ladepuffer (6x)

##### **Essigsäure (HAc)**

Ethanol abs. (EtOH)

Ethidiumbromid

Ethylendiamintetraacetat (EDTA)

EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin

##### **Fluoprep**

FluorSave

##### **Glukose**

Glycerin

Glycin

##### **Hefeextrakt**

##### **Immersionsöl liquid Type F**

##### **Kaliumchlorid (KCl)**

Kaliumhydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

Kanamycin

##### **Magermilchpulver**

Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O)

Magnesiumsulfat (MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O)

β-Mercaptoethanol (β-ME)

Peqlab, Erlangen (D)

Serva, Heidelberg (D)

Bio-Rad, München (D)

BD Biosciences, Heidelberg (D)

Sigma-Aldrich, München (D)

Roth, Karlsruhe (D)

Merck, Darmstadt (D)

Sigma-Aldrich, München (D)

Merck, Darmstadt (D)

Roche Diagnostics, Mannheim (D)

Sigma-Aldrich, München (D)

Sigma-Aldrich, München (D)

Fermentas, St. Leon-Rot (D)

Merck, Darmstadt (D)

Sigma-Aldrich, München (D)

Roth, Karlsruhe (D)

Roth, Karlsruhe (D)

Thermo-Fisher, München (D)

BioMérieux, Nürtingen (D)

Merck, Darmstadt (D)

Merck, Darmstadt (D)

Roth, Karlsruhe (D)

Roth, Karlsruhe (D)

Merck, Darmstadt (D)

Leica Microsystems, Wetzlar (D)

Merck, Darmstadt (D)

Roth, Karlsruhe (D)

Sigma-Aldrich, München (D)

Saliter, Obergünzburg (D)

Merck, Darmstadt (D)

Merck, Darmstadt (D)

Sigma-Aldrich, München (D)



Methanol (MeOH)	Sigma-Aldrich, München (D)
Monensin	Sigma-Aldrich, München (D)
<b>Natriumazid (NaN<sub>3</sub>)</b>	Merck, Darmstadt (D)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe (D)
Natriumdodecylphosphat (SDS)	Merck, Darmstadt (D)
<i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt (D)
Nonidet P40 (NP40)	Merck, Darmstadt (D)
<b>Pepton</b>	Merck, Darmstadt (D)
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Karlsruhe (D)
2-Propanol	Sigma-Aldrich, München (D)
Protein A-Sepharose	Sigma-Aldrich, München (D)
Rotiphorese® Gel 30	Roth, Karlsruhe (D)
<b>Salzsäure (HCl)</b>	Merck, Darmstadt (D)
Saccharose	Serva, Heidelberg (D)
<b>N, N, N', N', -Tetramethylethylendiamin (TEMED)</b>	Bio-Rad, München (D)
TransIT® LT1 Transfektionsreagenz	Mirus Bio, Madison (WI, USA)
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Acros Organics, Geel (B)
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München (D)
Tween® 20	Sigma-Aldrich, München (D)

### 3.2 Verbrauchsmaterialien

Cryo-Röhrchen, Polypropylen (2 ml)	Corning, Wiesbaden (D)
Deckgläser, Ø 12 mm	Menzel, Braunschweig (D)
Filterpapier (Whatman® 3 mm Chr)	Whatman, Maidstone (UK)
Gewebekulturröhrchen (TC-Tube), 12 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen (D)
Glasplatten <i>Mini Protean® System</i> (für WB)	Bio-Rad, München (D)
Mikroschraub Röhrchen	Sarstedt, Nürnbrecht (D)
Objektträger, 76 x 22 mm	Menzel, Braunschweig (D)
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Menasha (WI, USA)
PCR-Röhrchen, 0,2 ml	Biozym, Hessisch Oldendorf (D)
Petrischalen	Sarstedt, Nürnbrecht (D)
Pipetten <i>Cellstar®</i> (1, 2, 5, 10, 25 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen (D)
Pipettenspitzen Gelloader (0,1-200 µl)	Sarstedt, Nürnbrecht (D)
Pipettenspitzen <i>Matrix®</i> (1250 µl)	Thermo Fisher Scientific, München (D)

Pipettenspitzen <i>TipOne</i> ® (0.1-1 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl)	Starlab, Ahrensburg (D)
Polypropylen (PP)-Reaktionsgefäße, 15 ml/50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen (D)
Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran <i>Immobilon</i> (0,45 µm / 0,2 µm)	Merck, Darmstadt (D)
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Reaktionsgefäße, 2 ml	Eppendorf, Hamburg (D)
Skalpell no.22	Feather, Osaka (J)
µ-Slide 4 Well	ibidi, Martinsried (D)
Zellkulturplatten (6 well/24 well/96 well)	Greiner Bio-One, Frickenhausen (D)
Zellschaber	Greiner Bio-One, Frickenhausen (D)
Zentrifugenröhrchen <i>Ultra-Clear</i> ™ (25x89 mm, für SW32)	Beckman Coulter, Krefeld (D)

### 3.3 Kits

E.Z.N.A.® Fast Filter Plasmid DNA Maxi Kit	Omega Bio-tek, Norcross (GA, USA)
E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit	Omega Bio-tek, Norcross (GA, USA)
E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit	Omega Bio-tek, Norcross (GA, USA)
E.Z.N.A.® Probe Purification Kit	Omega Bio-tek, Norcross (GA, USA)
Omniscript® Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden (D)
QIAamp® Viral RNA Mini Kit	Qiagen, Hilden (D)
QuikChange® Multi Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent, Santa Clara (CA, USA)

### 3.4 Geräte

Brutschrank <i>HERAcell 150</i>	Thermo Fisher Scientific, München (D)
ChemiDoc™ XRS+	Bio-Rad, München (D)
DNA-Gelkammern	bsb11, Schauenburg (D)
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen (D)
Eppendorf <i>Centrifuge 5415D</i>	Eppendorf, Hamburg (D)
Eppendorf <i>Reference</i> ® Pipetten (0.1-2.5 µl, 0.5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg (D)
Feinwaage	Sartorius, Göttingen (D)
Fluoreszenzmikroskop <i>Axiovert200M</i>	Zeiss, Jena (D)
Fluoreszenzmikroskop <i>Leica DMI6000 CS</i>	Leica Microsystems, Wetzlar (D)

Konfokales Laserscanning Mikroskop (KLSM)	Leica Microsystems, Wetzlar (D)
<i>Leica TCS SP5 II</i>	
Geldokumentationssystem <i>GelDoc 2000</i>	Bio-Rad, München (D)
Heizblock <i>neoBlock1</i>	neoLab®, Heidelberg (D)
Horizontalschüttler <i>TR</i>	Infors AG, Bottmingen (CH)
Lichtmikroskop <i>Wilovert®</i>	Will, Wetzlar (D)
Lebendzellmikroskop <i>Nikon TE2000-E</i> (mit Intensilight, Nikon / DG4, Sutter)	Nikon Instruments Europe, Amsterdam (NL)
Magnetrührer	Heidolph, Kelheim (D)
Mikrowellengerät	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe (D)
Multikanal-Pipette <i>Matrix Impact<sup>2</sup>®</i>	Thermo Fisher Scientific, München (D)
Pipettierhilfe <i>accu-jet® pro</i>	Brand, Wertheim (D)
Reagenzglasnischer <i>Vortex Mixer</i>	neoLab®, Heidelberg (D)
Rotator <i>Stuart sb2</i>	Kobe, Marburg (D)
Rotor für UZ (SW32)	Beckman Coulter, Krefeld (D)
Semi-Dry-Blotter <i>Fastblot B34</i>	Biometra, Göttingen (D)
SDS-Gelkammern <i>Mini-Protean® System</i>	Bio-Rad, München (D)
Sicherheitswerkbank <i>BDK-SK 1200</i>	BDK, Sonnenbühl-Genkingen (D)
Spannungsquelle <i>Standard Power Pack P25</i>	Biometra, Göttingen (D)
Spektralphotometer <i>Nanodrop ND1000</i>	Peqlab, Erlangen (D)
Thermocycler <i>Primus</i>	Aviso Mechatronic Systems, Jena (D)
Thermomixer <i>5436</i>	Eppendorf, Hamburg (D)
Tischzentrifuge <i>5424</i>	Eppendorf, Hamburg (D)
Tischkühlzentrifuge <i>5417R</i>	Eppendorf, Hamburg (D)
Tischkühlzentrifuge <i>Heraeus Multifuge 3SR</i>	Thermo Fisher Scientific, München (D)
Ultrazentrifuge (UZ) <i>Optima™ L-80 XP</i>	Beckman Coulter, Krefeld (D)
Waage <i>excellence</i>	Sartorius, Göttingen (D)
Wasserbad <i>MT</i>	Lauda, Lauda-Königshofen (D)

### 3.5 Puffer und Lösungen

#### 3.5.1 Puffer

<b>Antikörper-Verdünnungspuffer für WB</b>	1 %	Magermilchpulver
	0,1 %	Tween® 20
	in	PBS <sub>def</sub>

<b>Blockierungspuffer für IFA (IF-BB)</b>	2 %	BSA
	5 %	Glycerin
	0,2 %	Tween® 20
	0,05 %	NaN <sub>3</sub> in PBS <sub>def</sub>
<b>Blockierungspuffer für WB</b>	10 %	Magermilchpulver
	in	PBS <sub>def</sub>
<b>Complete Protease-Inhibitor-Lösung (25x)</b>	1 Tablette ad 2 ml	Complete Protease-Inhibitor dH <sub>2</sub> O
<b>Co-IP-Puffer (+ Complete)</b>	100 mM	NaCl
	20 mM	Tris-HCl pH 8,0
	5 mM	EDTA, pH 8,0
	1 %	NP40
	1 x	Complete Protease-Inhibitor-Lsg.
	in	dH <sub>2</sub> O
<b>Lysis-Puffer (für IP)</b>	1 %	Triton X-100
	in	Co-IP-Puffer (+ Complete)
<b>PBS<sub>def</sub>, pH 7.5 (Phosphatpuffer-defizient)</b>	8 g	NaCl
	0,2 g	KCl
	1,15 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
	0,2 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	ad 1 l	dH <sub>2</sub> O
<b>PBS<sup>++</sup>, pH 7.4</b>	PBS <sub>def</sub> supplementiert mit	
	0,9 mM	CaCl <sub>2</sub>
	1,1 mM	MgCl <sub>2</sub>

<b>Probenpuffer (4x)</b>	20 ml	Glycerin
	10 ml	$\beta$ -Mercaptoethanol
	4 g	SDS
	10 ml	1 M Tris-HCl, pH 6,8
	200 mg	Bromphenolblau
	ad 100 ml	dH <sub>2</sub> O
<b>Proteingellaufpuffer (10x)</b>	10 g	SDS
	30 g	Tris
	144 g	Glycin
	ad 1 l	dH <sub>2</sub> O
<b>SDS-PAGE-Sammelgelpuffer</b>	0,4 %	SDS
	0,5 M	Tris-HCl, pH 6,8
<b>SDS-PAGE-Trenngelpuffer</b>	0,4 %	SDS
	1,5 M	Tris-HCl, pH 8,8
<b>TAE-Puffer, pH 8.0 (50x)</b>	242 g	Tris
	57,1 g	Essigsäure
	100 ml	0.5 M EDTA, pH 8.0
	ad 1 l	dH <sub>2</sub> O
<b>Transferpuffer für WB (1x)</b>	300 mg	Tris
	144 mg	Glycin
	100 ml	EtOH
	ad 1 l	dH <sub>2</sub> O
<b>Waschpuffer für WB (PBST)</b>	0,1 %	Tween® 20
	in	PBS <sub>def</sub>

### 3.5.2 Lösungen

<b>Ampicillin (Amp)-Stammlösung (100 mg/ml)</b>	100 mg	Ampicillin
	ad 1 ml	dH <sub>2</sub> O

<b>Kanamycin (Kan)-Stammlösung (25 mg/ml)</b>	25 mg	Kanamycin
	ad 1 ml	dH <sub>2</sub> O

### 3.5.3 Substratlösungen für Western Blot-Analysen

Luminata Forte Western HRP Substrat	Merck, Darmstadt (D)
SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific, München (D)

## 3.6 Wachstumsmedien

### 3.6.1 Wachstumsmedien für Bakterienzellen

<b>LB-Agar (1,5 %)</b>	3,75 g	Bacto™-Agar
	ad 250 ml	LB-Medium
<b>LB-Medium</b>	10 g	NaCl
	5 g	Hefeextrakt
	10 g	Pepton
	ad 1 l	dH <sub>2</sub> O
<b>NZY<sup>+</sup>-Medium</b>	10 g	Caseinhydrolysat
	5 g	Hefeextrakt
	5 g	NaCl
	ad 1 l	dH <sub>2</sub> O
	+ 12,5 ml	1 M MgCl <sub>2</sub>
	+ 12,5 ml	1 M MgSO <sub>4</sub>
	+ 20 ml	20 % Glukose in dH <sub>2</sub> O

### 3.6.2 Zellkulturmedien

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco®/Invitrogen™, Karlsruhe (D)
Leibovitz's L-15 Medium	Thermo Fisher, München (D)
Minimum Essential Medium (MEM)	Gibco®/Invitrogen™, Karlsruhe (D)
OPTI-MEM® I	Gibco®/Invitrogen™, Karlsruhe (D)
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco®/Invitrogen™, Karlsruhe (D)
L-Glutamin, 200 mM (100x)	Gibco®/Invitrogen™, Karlsruhe (D)
Penicillin/Streptomycin, 5000 IU/ml	Gibco®/Invitrogen™, Karlsruhe (D)
MEM Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAS)-Lösung (100x)	Gibco®/Invitrogen™, Karlsruhe (D)

<b>DMEM<sup>++(0%)</sup></b> (0 % FCS, 1 % P/S, 1 % Q)	500 ml 5 ml 5 ml	DMEM L-Glutamin, 200 mM (100x) Penicillin/Streptomycin, 5000 IU/ml
<b>DMEM<sup>+++ (3%)</sup></b> (3 % FCS, 1 % P/S, 1 % Q)	500 ml 15 ml 5 ml 5 ml	DMEM FCS L-Glutamin, 200 mM (100x) Penicillin/Streptomycin, 5000 IU/ml
<b>DMEM<sup>+++</sup></b> (10 % FCS, 1 % P/S, 1 % Q)	500 ml 50 ml 5 ml 5 ml	DMEM FCS L-Glutamin, 200 mM (100x) Penicillin/Streptomycin, 5000 IU/ml
<b>MEM<sup>++(4%)</sup></b> (0 % FCS, 1 % P/S, 1 % Q)	500 ml 20 ml 5 ml 5 ml	MEM FCS L-Glutamin, 200 mM (100x) Penicillin/Streptomycin, 5000 IU/ml
<b>Leibovitz's<sup>++++</sup></b> (20 % FCS, 1 % P/S, 1 % Q, 1 % NEAS)	500 ml 50 ml 5 ml 5 ml 5 ml	Leibovitz's L15 Medium FCS L-Glutamin, 200 mM (100x) Penicillin/Streptomycin, 5000 IU/ml NEAS (100x)

### 3.7 Nukleotide und Nukleinsäuren

#### 3.7.1 DNA-Größenmarker, freie Nukleotide und Random Primer

Desoxynukleotid (dNTP)-Mix (je 10 mM), <i>bestehend aus:</i> dATP (2'-Desoxyadenosin-5'-Triphosphat) dCTP (2'-Desoxycytosin-5'-Triphosphat) dGTP (2'-Desoxyguanosin-5'-Triphosphat) dTTP (2'-Desoxythymidin-5'-Triphosphat)	Peqlab, Erlangen (D)
O'Gene Ruler™ 1 kb Plus DNA Ladder (250-20.000 bp)	Thermo Fisher, München (D)
Random Primer Mix (60 µM)	NEB, Frankfurt (D)

### 3.7.2 DNA-Oligonukleotide (Primer für PCR/Sequenzierungen)

<u>Nr.</u>	<u>Name</u>	<u>Sequenz (5' – 3')</u>
<u>Primer für analytische PCR und Sequenzierungen</u>		
20	VP30-2157 fwd	tac ctc cac cac tgc cca cag ccc
72	GPv-7244 fwd	cct ctg gag gga agg cga cat g
1233	pCAGGS-forw	cct tct tct ttt tcc tac ag
1234	pCAGGS-rev	cct tta tta gcc aga agt cag
2709	GFP/YFP (fwd)	gat cac tct cgg cat gga cga g
2710	GFP/YFP (rev)	ctc gtc cat gcc gag agt gat c
3038	JUNV-L2-mCherry (fwd)	ggc cac tac gac gct gag g
3602	eGFP_Insert-Seq-Primer fwd	ccg acc act acc agc aga aca
3612	Rab9wt_RueckMut_V10I	ttt tta aag taa ttc tcc ttg gag atg gtg gag ttg gg
3625	MARV-GP_TMD rev	gca aaa tgc cca agt tag taa gaa cac c
3626	LASV-GPC_TMD rev	gct aat aag ata gaa act tgt act gaa cac
3631	MARV-GP fwd_after MLD	gaa ttt gga gcg ttc agg agg atg ac
3832	Rab13synth rev	ctg act tct ggc taa taa agg
3948	Rab5_fwd_BglII	caa gat cta tgg cta gtc gag gc
3951	Rab5_rev_Sall	gag tcg act tag tta cta caa cac tg
4620	pEGFPvector_rev	cat ttt atg ttt cag gtt cag
4621	MyoVa_2200	gtt acc tga gtt taa aat gct
4622	MyoVa_3200	tca ggg cgc act cct ctc act
4623	MyoVa_4200	gat gag cag aat aaa gac tac
4624	MyoVa_5200	cag ctg gtg agc caa aaa gaa
4625	MyoVa_2200	cag cct tcc tga gtt taa gga
4626	MyoVa_3200	tcc tgc cac caa cac agc taa
4627	MyoVa_4200	cag cgg aag att gat gac cag
4628	MyoVa_5000	atg cag ata tag cct aca ata
4629	MyoVaTail_2150	gag cag gag aag cag gtg atg
4637	MyoVaTail 2950	gaa cta gaa gtg ggc ca

**Tabelle 3.1: Für PCR und Sequenzierungen verwendete Primer.**

Die Primer-Synthesen wurden von Dr. M. Krause am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung in Marburg (#20, #72) bzw. durch die Firma Invitrogen (Karlsruhe, D) durchgeführt.



### 3.7.3 „small interfering RNAs“ (siRNAs)

ON-TARGETplus Human RAB11A (8766)  
siRNA - SMARTpool

Dharmacon, Lafayette (CO, USA)

In dieser Arbeit wurde eine kommerziell erhältliche Mischung von vier verschiedenen siRNAs gegen das humane Rab11 verwendet (siRNA-Pool), die im Folgenden inklusive ihrer Sequenz einzeln aufgeführt sind.

ON-TARGETplus SMARTpool siRNA  
J-004726-07, RAB11A

gca aca aug ugg uuc cua u

ON-TARGETplus SMARTpool siRNA  
J-004726-08, RAB11A

caa gag cga uau cga gcu a

ON-TARGETplus SMARTpool siRNA  
J-004726-09, RAB11A

gug cag ugc ugu cag aac a

ON-TARGETplus SMARTpool siRNA  
J-004726-10, RAB11A

gag auu uac cgc auu guu u

### 3.8 Vektoren und rekombinante Plasmide

pCAGGS-MARV-GP	(MARV Musoke)	Institut für Virologie (AG Becker), Marburg
pCAGGS-MARV-GPΔMLD-mCherry	(MARV Musoke)	Institut für Virologie (AG Becker), Marburg
pCAGGS-MARV-VP40	(MARV Musoke)	Institut für Virologie (AG Becker), Marburg
pCAGGS-MARV-NP	(MARV Musoke)	Institut für Virologie (AG Becker), Marburg
pCAGGS-EBOV-GP	(EBOV Mayinga)	Institut für Virologie (AG Becker), Marburg
pCAGGS-NiV-F-HA	(NiV Malaysia)	Institut für Virologie (AG Maisner), Marburg
pCAGGS-NiV-G-HA	(NiV Malaysia)	Institut für Virologie (AG Maisner), Marburg
pCAGGS-IAV-HA	(A/dk/bavaria/1/77)	Institut für Virologie (AG Matrosovich), Marburg
phCMV-VSV-G	(VSV Indiana)	J. Rose, Yale University School of Medicine, New Haven (CT, USA)
pEGFP-C3 (Leervektor)		Clontech, St-Germain-en-Laye (F)
pEGFP-C3-Rab5		Institut für Virologie (AG Maisner), Marburg -> subkloniert in pEGFP-C3-Vektor (s. 4.1.1)
pEGFP-N1-Rab7		A. Helenius, IBC, Zürich (CH)
pEGFP-C3-Rab8		S. Schuck, MPI Dresden -> Q60R-Mutation entfernt (s. Halwe, 2014)

pEGFP-C3-Rab9	S. Pfeffer, Department of Biochemistry, Stanford University (CA, USA) -> V10I-Mutation entfernt (s. 4.1.2)
pEGFP-C1-Rab10	S. Schuck, MPI Dresden
pEGFP-C3-Rab11	R. Jacob, Institut für Zytobiologie, Marburg
pEGFP-C3-Rab11 S25N (DN)	R. Jacob, Institut für Zytobiologie, Marburg
pEGFP-C3-Rab11 Q70L (KA)	<i>generiert durch in vitro-Mutagenese des pEGFP-Rab11 durch G. Schudt, Institut für Virologie, Marburg</i>
pEGFP-C3-Rab13	Institut für Virologie, Marburg
pEGFP-Myosin Va Tail	R. Cheney, University of North Carolina, Chapel Hill (USA)
pEGFP-Myosin Vb Tail	R. Cheney, University of North Carolina, Chapel Hill (USA)
pEGFP-Myosin Vc Tail	R. Cheney, University of North Carolina, Chapel Hill (USA)
pEGFP-Myosin Vb wt	R. Cheney, University of North Carolina, Chapel Hill (USA)
pmCherry-Rab11	Michael Davidson, Florida State University, Tallahassee ( <i>Addgene Plasmid #55124</i> )

### 3.9 Proteine und Peptide

#### 3.9.1 Enzyme und Proteine

Alkaline Phosphatase (1 U/μl)	Roche, Basel (CH)
<i>Pwo</i> -DNA-Polymerase (1 U/μl)	Peqlab, Erlangen (D)
Restriktionsendokuklease Bgl II (10 U/μl)	NEB, Frankfurt (D)
Restriktionsendokukleas Sal I-HF (20 U/μl)	NEB, Frankfurt (D)
Ribolock RNase Inhibitor (40 U/μl)	Thermo Fisher Scientific, München (D)
T4 DNA-Ligase H.C. (5 U/μl)	invitrogen, Karlsruhe (D)

#### 3.9.2 Proteinmarker

PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, München (D)
--	---------------------------------------

### 3.9.3 Antikörper

#### Primär-Antikörper

Name	Spezies	Hersteller	Arbeits- verdünnungen	
			IFA	WB
$\alpha$ -MARV-GP (31-11-9), monoklonal	Maus	Institut für Virologie (AG Becker), Marburg (D)	1:80	-
$\alpha$ -MARV-GP (50-6-10), monoklonal	Maus	Institut für Virologie (AG Becker), Marburg (D)	1:50	1:100
$\alpha$ -MARV-GP (0303-007), polyklonal	Kaninchen	ibt Bioservices, Rockville (MD, USA)	1:50	-
$\alpha$ -MARV-GP (non glyc 95/3, 11.9.96), polyklonal	Kaninchen	Institut für Virologie (AG Becker), Marburg (D)	1:100	-
$\alpha$ -MARV-VP40 (40-2-2), monoklonal	Maus	Institut für Virologie (AG Becker), Marburg (D)	1:100	-
$\alpha$ -MARV-NP (59-9-10), monoklonal	Maus	Institut für Virologie (AG Becker), Marburg (D)	1:100	-
$\alpha$ -MARV-NC (4.4.96), polyklonal	Kaninchen	Institut für Virologie (AG Becker), Marburg (D)	1:100	-
$\alpha$ -MARV (37/6), polyklonal (Serum)	Ziege	Institut für Virologie (AG Becker), Marburg (D)	1:200 (Plaque- Assay)	-
$\alpha$ -EBOV-GP (534, 2.4 mg/ml), monoklonal	Maus	Institut für Virologie (AG Becker), Marburg (D)	1:100	-
$\alpha$ -VSV-G (mcmA), monoklonal	Maus	J. Rose, Yale University, New Haven (CT, USA)	1:10	-
$\alpha$ -IAV-HA (dk/Alberta/35/76), polyklonal	Kaninchen	Institut für Virologie (AG Matrosovich), Marburg (D)	1:100	-
$\alpha$ -NiV (Serum), polyklonal	Meer- schweinchen	Institut für Virologie (AG Maisner), Marburg (D)	1:500	-
$\alpha$ -CD71/TfR (3B8 2A1, sc- 32272), monoklonal	Maus	Santa Cruz Biotechnology Dallas (TX, USA)	1:50	-
$\alpha$ -EEA1 (610457), monoklonal	Maus	BD Biosciences Heidelberg (D)	1:20	-
$\alpha$ -GM130 (610823), monoklonal	Maus	BD Biosciences Heidelberg (D)	1:10	-

$\alpha$ -LAMP1 (H4A3, ab25630), monoklonal	Maus	Abcam Cambridge (UK)	1:30	-
$\alpha$ -LAMP2 (555803), monoklonal	Maus	BD Biosciences Heidelberg (D)	1:40	-
$\alpha$ -Rab8A (610845), monoklonal	Maus	BD Biosciences Heidelberg (D)	1:10	-
$\alpha$ -Rab11 (D4F5, 5589), polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling, Frankfurt (D)	1:10	-
$\alpha$ -Rab11 (610657), monoklonal	Maus	BD Biosciences Heidelberg (D)	-	1:200
$\alpha$ -Rab11B (2414), polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling, Frankfurt (D)	-	1:200
$\alpha$ -TGN46 (T7576), polyklonal	Kaninchen	Sigma-Aldrich, München (D)	1:10	-
$\alpha$ -Tubulin (T9026) monoklonal	Maus	Sigma-Aldrich, München (D)	-	1:5000
$\alpha$ -GFP (600-101-215), polyklonal	Ziege	Rockland Immunochemicals, Limerick (PA, USA)	-	1:1000
$\alpha$ -HA-Tag (600-401-384), polyklonal	Kaninchen	Rockland Immunochemicals, Limerick (PA, USA)	1:100	-

Tabelle 3.2: Verwendete Primär-Antikörper.

**Sekundär-Antikörper**

Name	Spezies	Hersteller	Arbeits- verdünnungen	
			IFA	WB
$\alpha$ -Maus (H+L), A32723 <b>Alexa Fluor 488</b> Plus-gekoppelt	Ziege	Thermo Fisher Scientific, München (D)	1:400	-
$\alpha$ -Maus (H+L), A11004 <b>Alexa Fluor 568</b> -gekoppelt	Ziege	Thermo Fisher Scientific, München (D)	1:400	-
$\alpha$ -Maus (H+L), A11005 <b>Alexa Fluor 594</b> -gekoppelt	Ziege	Thermo Fisher Scientific, München (D)	1:400	-
$\alpha$ -Maus (H+L), A21235 <b>Alexa Fluor 647</b> -gekoppelt	Ziege	Thermo Fisher Scientific, München (D)	1:400	-

$\alpha$ -Kaninchen (H+L), A11008 <b>Alexa Fluor 488</b> -gekoppelt	Ziege	Thermo Fisher Scientific, München (D)	1:400	-
$\alpha$ -Kaninchen (H+L), A11012 <b>Alexa Fluor 594</b> -gekoppelt	Ziege	Thermo Fisher Scientific, München (D)	1:400	-
$\alpha$ -Kaninchen (H+L), A32733 <b>Alexa Fluor 647</b> -gekoppelt	Ziege	Thermo Fisher Scientific, München (D)	1:200	-
$\alpha$ -Kaninchen (H+L), M10992 <b>Marina Blue</b> -gekoppelt	Ziege	Invitrogen, Karlsruhe (D)	1:40	-
$\alpha$ -Ziege (H+L), <b>Alexa Fluor 488</b> -gekoppelt	Ziege	Thermo Fisher Scientific, München (D)	1:400	-
$\alpha$ -Maus, P0447 HRP-gekoppelt	Ziege	Dako, Glostrup (DK)	-	1:40000
$\alpha$ -Kaninchen (MinX), 711-036-152, POD-gekoppelt	Ziege	Dianova, Hamburg (D)	-	1:40000
$\alpha$ -Ziege, 705-035-003 POD-gekoppelt	Esel	Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire (UK)	-	1:40000
Streptavidin (3999), HRP-gekoppelt	<i>S. avidinii</i>	Cell Signaling, Frankfurt (D)	-	1:1000 - 1:2000

Tabelle 3.3: Verwendete Sekundär-Antikörper.

### 3.10 Zellen

#### 3.10.1 Prokaryotische Zellen

*E. coli*-Stamm XL1-Blue Agilent, Santa Clara (USA)

Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI<sub>q</sub>Z<sub>M</sub>15 Tn10 (Tetr<sub>r</sub>)]

*E. coli*-Stamm XL10-Gold<sup>®</sup> ultrakompetent Agilent, Santa Clara (USA)

Genotyp: Tetr<sub>r</sub>[(mcrA)183  $\Delta$ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI<sub>q</sub>Z<sub>M</sub>15 Tn10 (Tetr<sub>r</sub>) Amy Cam<sub>r</sub>]

#### 3.10.2 Eukaryotische Zellen

HuH7-Zellen humane Hepatokarzinomzellen

VeroE6-Zellen Nierenzellen der Grünen Meerkatze (*Chlorocebus*)

### 3.11 Viren

MARV, Isolat Musoke (Kenia, 1980)

Institut für Virologie, Marburg (D)

### 3.12 Software

Image Lab 4.0	Bio-Rad, München (D)
Chromas Lite 2.1.1	Technelysium, South Brisbane (AUS)
Clone Manager 9	Sci-Ed-Software, Morrisville (USA)
Prism 8	GraphPad Software, San Diego (CA, USA)
ImageJ/Fiji v. 1.52i (Schindelin et al., 2012)	ImageJ Development Team, University of Wisconsin, Madison (WI, USA)
Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS AF) 2.6.1.7314	Leica Microsystems, Wetzlar (D)
Nikon NIS Elements	Nikon Instruments Europe, Amsterdam (NL)
Microsoft Office 2013/2016	Microsoft, Redmond (USA)

### 3.13 Plugins und Makros für ImageJ/Fiji

3D Suite	Ollion et al. (2013)
Coloc2	<a href="https://imagej.net/Coloc_2">https://imagej.net/Coloc_2</a>
JACoP	Bolte und Cordelières (2006)

Zudem wurden selbst programmierte Makros verwendet, deren Codes sowohl dieser Arbeit als Anhang beigelegt wurden als auch auf Anfrage zur Verfügung gestellt werden können.

## 4 Methoden

### 4.1 Molekularbiologische Methoden

#### 4.1.1 Amplifikation von spezifischen DNA-Sequenzen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR, die eine *in vitro*-Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen ermöglicht, wurde entsprechend der Beschreibung in meiner Masterarbeit durchgeführt (Halwe, 2014). Die Amplifikate werden im Anschluss mittels einer analytischen Agarose-Gelelektrophorese (4.1.4) überprüft.

Die PCR wurde in dieser Arbeit im Rahmen der Klonierung der pEGFP-Rab5- und pEGFP-Rab13-Konstrukte verwendet.

Der OLR des caninen Rab5 wurde aus dem Vektor pGFP-Rab5 (Institut für Virologie, AG Maisner) amplifiziert (Primer #3948 und #3951), mittels Restriktionsverdau (Bgl II, Sal I) ausgeschnitten und in den Vektor pEGFP-C3 (Clontech) subkloniert. Der OLR des humanen Rab13, flankiert durch Primer-Bindungs- sowie Restriktionsschnittstellen, wurde durch die Firma Thermo Fisher Scientific (Gene Art Strings) synthetisiert. Die DNA wurde anschließend mittels PCR amplifiziert (Primer #1233 und #3832), mit Restriktionsendonukleasen (Bgl II, Sal I) verdaut und in den Vektor pEGFP-C3 (Clontech) subkloniert. Die Vervielfältigung der Plasmide erfolgte in *E. coli XL1 Blue*.

#### 4.1.2 Ortsgerichtete Mutagenese von Plasmid-DNA

Bei der ortsgerichteten Mutagenese von Plasmid-DNA werden über den Primer spezifische Mutationen auf DNA-Ebene in die Matrizen-Sequenz eingefügt. Die Durchführung dieser Methode wurde mit dem entsprechend der Beschreibung in meiner Masterarbeit durchgeführt (Halwe, 2014).

Die ortsgerichtete Mutagenese wurde in dieser Arbeit verwendet, um eine Punktmutation im pEGFP-Rab9-Konstrukt (V10I) zurückzumutieren (Primer #3612). Die Vervielfältigung des Plasmids erfolgte in *E. coli XL10 Gold*.

#### 4.1.3 Aufreinigung von Nukleinsäuren

Die Durchführung dieser Methode wurde mit dem *E.Z.N.A.® Probe Purification Kit* anhand des Herstellerprotokolls entsprechend der Beschreibung in meiner Masterarbeit durchgeführt (Halwe, 2014).



#### 4.1.4 Analytische und präparative Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren

Mittels der Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente elektrophoretisch anhand ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Die Durchführung dieser Methode wurde entsprechend der Beschreibung in meiner Bachelorarbeit durchgeführt (Halwe, 2012).

#### 4.1.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die Extraktion der DNA aus Agarosegelen wurde unter Einsatz des E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit anhand des Herstellerprotokolls durchgeführt. Die aufgereinigte DNA wurde im terminalen Schritt in 30 µl dH<sub>2</sub>O eluiert.

#### 4.1.6 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Durchführung dieser Methode wurde entsprechend der Beschreibung in meiner Bachelorarbeit durchgeführt (Halwe, 2012).

#### 4.1.7 Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNA

Zur Vermeidung einer Religation von mit Restriktionsendonukleasen verdauten Vektoren wurden die freien 5'-Phosphatgruppen durch die Behandlung mit Alkaliner Phosphatase (AIP) entfernt. Dazu wurde dem Restriktionsverdau 1 µl AP zugefügt und der Ansatz 1 h bei 37 °C (höhere Stabilität der AIP), gefolgt von einer zweiten Inkubation für 30 min bei 52 °C (höhere Aktivität der AIP).

#### 4.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten und linearisierten Vektoren

Die Durchführung dieser Methode wurde mit den unten aufgeführten Änderungen entsprechend der Beschreibung in meiner Bachelorarbeit durchgeführt (Halwe, 2012).

Die Ligation erfolgte in einem Insert/Vektor-Verhältnis von 3:1 bei einer Vektormenge von 50 ng (+), zusätzlich wurde eine Negativkontrolle (-) ohne Insert angesetzt. Der Ligationsansatz wurde für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Insert-Menge (+) wurde nach folgender Formel berechnet (s. Online-Tool *NEB-BioCalculator*):

$$X \text{ g Insert} = \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}} \text{ molares Verhältnis} \cdot \text{Masse des Vektors [g]} \cdot \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}} \text{ Längenverhältnis [bp]}$$

Ansatz:

	(+)	(-)
<b>Vektor</b>	50 ng	50 ng
<b>Insert</b>	nach Formel	-
<b>Ligase Puffer</b> (5x), invitrogen	4 µl	4 µl
<b>T4 DNA Ligase H.C.</b> (5 U/µl), invitrogen	0,2 µl	0,2 µl
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	ad 20 µl	ad 20 µl

**4.1.9 Transformation von Plasmid-DNA in bakterielle Zellen**

Zur Reproduktion von Plasmiden werden diese in sog. ultrakompetente Bakterienzellen eingebracht. Die Durchführung dieser Methode wurde entsprechend der Beschreibung in meiner Bachelorarbeit durchgeführt (Halwe, 2012).

**4.1.10 Kultivierung und Selektion rekombinanter Bakterienzellen**

Die Anzucht der Bakterien erfolgt in LB-Medium bzw. auf LB-Agar, komplementiert mit einem entsprechenden Antibiotikum als Selektionsmarker. Die Durchführung dieser Methode wurde entsprechend der Beschreibung in meiner Masterarbeit durchgeführt (Halwe, 2014).

**4.1.11 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen**

Zur Isolation der Plasmid-DNA müssen die Bakterienzellen lysiert und die DNA anschließend aufgereinigt werden. Die Durchführung dieser Methode wurde mit dem *E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit* bzw. dem *E.Z.N.A.® Fast Filter Plasmid DNA Maxi Kit* anhand des Herstellerprotokolls entsprechend der Beschreibung in meiner Masterarbeit durchgeführt (Halwe, 2014).

Die präparierte Plasmid-DNA wurde anschließend photometrisch quantifiziert (4.1.8) sowie mittels Sequenzierung (4.1.9) analysiert.

**4.1.12 Konzentrations- und Reinheitsanalysen von DNA**

Die DNA-Konzentration einer Probe kann mithilfe spektralphotometrischer Messungen durch den *Nanodrop ND1000* bestimmt werden. Die Durchführung dieser Methode wurde entsprechend der

Beschreibung in meiner Bachelorarbeit durchgeführt (Halwe, 2012). Zur Analyse im wurden jeweils 1,5 µl Probe aufgetragen.

#### 4.1.13 DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode

Die Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode, durch die die genaue Basenabfolge einer DNA-Sequenz aufgeklärt werden kann, wurde mit unten genannten Änderungen entsprechend der Beschreibung in meiner Bachelorarbeit durchgeführt (Halwe, 2012).

Die Proben wurden nach unten angegebenem Schema angesetzt und zur Ausführung der Sequenzierungsreaktion an die Firma „Seqlab Sequence Laboratories Göttingen GmbH“ übergeben.

<u>Reaktionsansatz:</u>	1,2 µg	DNA-Template
	30 pmol	Sequenzierungs-Primer
	ad 15 µl	dH <sub>2</sub> O

## 4.2 Proteinbiochemische Methoden

### 4.2.1 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur näheren Untersuchung von Proteinen mittels Western Blot-Analyse (4.2.2) wurden diese zunächst ihrem Molekulargewicht entsprechend mithilfe einer diskontinuierlichen SDS-PAGE aufgetrennt. Diese Methode wurde mit unten genannten Änderungen entsprechend der Beschreibung in meiner Masterarbeit durchgeführt (Halwe, 2014).

Je nach Proteingröße wurden SDS-Gele mit 10 % bzw. 12 % Polyacrylamid verwendet. Standardmäßig kamen dabei 10 %-ige Gele zum Einsatz, während für die Detektion der kleineren Rab-GTPasen (ca. 24 kDa) 12 %-ige Gele verwendet wurden. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 110 V (Sammelgel) bzw. 160 V (Trenngel) und maximaler Stromstärke.

### 4.2.2 Proteintransfer mittels Western Blot (WB) und Immundetektion

Per SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden im Anschluss auf eine PVDF-Membran transferiert, die eine immunhistochemische Detektion ermöglicht. Die Durchführung des WB nach dem Semi-Dry-Blot-

Prinzip erfolgte mit unten genannten Änderungen entsprechend der Beschreibung in meiner Masterarbeit (Halwe, 2014).

Der Transfer erfolgte je nach Proteingröße nach unterschiedlichen Protokollen. Das Standardprotokoll (10 %-Gele) sah einen Transfer für 25 min bei 20 V und maximaler Stromstärke vor. Die Rab-GTPasen (12 %-Gele) wurden hingegen für 90 min bei einer Stromstärke von 43 mA/Blot und maximaler Spannung transferiert. Die Blockierung freier Bindungsstellen auf der Membran erfolgte in 10 % Milch/PBS<sub>def</sub>, entweder über Nacht bei 4 °C oder für 1 h bei Raumtemperatur. Da das in der Milch enthaltene Biotin vor allem bei längerer Inkubation zu unspezifischen Hintergrundsignalen führen kann, wenn die Membranen mit Streptavidin-HRP gefärbt werden, wurde die Blockierung von mit Streptavidin-HRP zu färbenden Blots ausschließlich für 1 h bei Raumtemperatur durchgeführt.

Für die Immunfärbung wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in der Primär-AK-Lösung inkubiert. Aufgrund der schwachen endogenen Signale der Rab-GTPasen wurden diese Proteine ausschließlich über Nacht gefärbt. Im Falle des Rab11B wurden die Blots zudem sowohl im 1°- als auch im 2°-Antikörper jeweils zweimal inkubiert, da das Signal nach dem ersten Durchgang zu schwach war.

Die Detektion erfolgte auf der Grundlage der Chemilumineszenz. Dazu wurden die Blots mit einer entsprechenden Substratlösung (*SuperSignal® West Dura Extended*, dem sensitiveren *Luminata Forte Western HRP Substrat* oder dem noch sensitiveren *SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity*) für 5 min inkubiert und am ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad) ausgewertet. Die Quantifizierung der Bandenintensitäten erfolgte mithilfe der Software „Image Lab“ (Bio-Rad).

### 4.3 Zellbiologische Methoden

#### 4.3.1 Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen

Zur rekombinanten Expression von Proteinen in eukaryotischen Zellen wurden diese mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert. Die Durchführung dieser Methode wurde mit unten genannten Änderungen entsprechend der Beschreibung in der Bachelorarbeit von Sandro Halwe durchgeführt (Halwe, 2012).

Die Transfektion wurde in dieser Arbeit direkt im Wachstumsmedium (DMEM<sup>+++</sup>(10%)) durchgeführt, da sich die Präsenz von FCS in diesem System als nicht abträglich für die Transfektionseffizienz erwiesen hat. Um zytotoxische Effekte sowie DNA-Artefakte in der DAPI-Färbung durch überschüssige Plasmid-DNA zu minimieren, wurde das Transfektionsmedium 4 h *post transfectionem* (hpt) mit

DMEM<sup>+++</sup>(3%) bzw. 3 hpt mit Leibovitz's<sup>++++</sup> ausgetauscht. Die jeweiligen Volumina der Transfektionsansätze können der unten stehenden Tabelle entnommen werden.

Die Inkubation der transfizierten Zellen bei 37 °C variierte abhängig von der Fragestellung zwischen 16 und 24 h.

Größe der Zellkulturplatte	Vol. (vorgelegtes Medium)	Vol. (Transfektionsansatz)	Mediumwechsel 3 bzw. 4 hpt zu
<u>24 well</u> (IFA)	1 ml DMEM <sup>+++</sup> (10%)	100 µl	1 ml DMEM <sup>+++</sup> (3%), 4 hpt
<u>6 well</u> (OBA)	3 ml DMEM <sup>+++</sup> (10%)	300 µl	3 ml DMEM <sup>+++</sup> (3%), 4 hpt
<u>4 well ibidi</u> (Live Cell Imaging)	1 ml DMEM <sup>+++</sup> (10%)	100 µl	1 ml Leibovitz's <sup>++++</sup> , 3 hpt

Tabelle 4.1: Volumina der Transfektionsansätze in verschiedenen Zellkulturplatten.

#### 4.3.2 Ernte von Zellen für die Analyse im Western Blot (WB)

Um Zellen im Western Blot analysieren zu können, müssen diese zunächst geerntet und lysiert werden. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen in 1 ml PBS<sub>def</sub> mit einem Zellschaber abgelöst und im PBS<sub>def</sub> resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend in 1,5 ml-Reaktionsgefäße transferiert und 1,5 min bei 5 000 rpm zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 2x SDS-Probenpuffer resuspendiert und bei -20 °C eingefroren. Neben dem denaturierenden SDS enthielt der Probenpuffer zudem β-Mercaptoethanol zur Lösung von Disulfidbrücken. Vor dem Auftragen in der SDS-PAGE (4.2.1) wurden die Proben zusätzlich 5 min bei > 95° C aufgeköcht.

#### 4.3.3 Oberflächenbiotinylierungs-Assay (OBA)

Um die Expressionslevel von MARV-GP an der Zelloberfläche zu untersuchen, wurde ein OBA durchgeführt, bei dem spezifisch die an der Oberfläche lokalisierten Proteine mit Biotin markiert werden. Um spezifisch das biotinylierte MARV-GP zu analysieren, wurde dieses anschließend mittels Protein A-Sepharose sowie eines monoklonalen Maus-α-GP-Antikörpers präzipitiert. Protein A stammt aus *Streptococcus sp.* und bindet mit hoher Affinität den konstanten F<sub>c</sub>-Teil von Immunglobulinen aus der Maus. Nach der Immunpräzipitation (IP) kann sowohl das biotinylierte Oberflächen-GP (Streptavidin) als auch das Gesamt-GP (monoklonale α-GP-Antikörper) mittels Western Blot analysiert werden.

Im ersten Schritt wurde das Zellkulturmedium abgenommen, die Zellen mit PBS<sup>++</sup> gewaschen und anschließend die Proteine auf der Zelloberfläche für 30 min bei 4 °C mit membran-impermeablem Sulfo-NHS-Biotin (1 mg/ml in PBS<sup>++</sup>) markiert. Zur Bindung an Proteine ist das Biotin mit einem aktivierten NHS-Ester modifiziert, das mit den Aminogruppen der Proteine reagiert und somit die Biotin-Markierung vermittelt, während die Sulfo-Gruppe dem Biotin die Membran-Impermeabilität verleiht. Zudem wurden die Biotinylierung sowie alle Schritte bis zur Zellernte bei 4 °C bzw. auf Eis durchgeführt, um eine Aufnahme des Biotins via Endozytose zu verhindern. Nach der Markierung wurde überschüssiges Biotin in 0,1 M Glycin/PBS<sup>++</sup> abgesättigt, die Zellen anschließend in 1 ml PBS<sub>def</sub> geerntet und für 1,5 min bei 5000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen für 20 min auf dem Schüttler in 500 µl (GP + Myosine) bzw. 250 µl (Rab11 Knockdown) Lysis-Puffer lysiert. Darauf folgte ein zehnminütiger Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm, um Zelltrümmer zu entfernen. Vom Überstand wurden im Anschluss a) 45 µl Zelllysat als Ausgangsmaterial sowie b) entweder 420 µl (OBA, GP + Myosine) oder 200 µl (Rab11 Knockdown) für die IP abgenommen. Während das abgenommene Lysat mit 15 µl 4x SDS-Probenpuffer versetzt und bei -20 °C eingefroren wurde, wurde zu der IP-Probe 5 µl eines monoklonalen Maus-α-GP-Antikörpers (50-6-10) sowie 50 µl Protein A-Sepharose hinzugegeben. Zur Präzipitation des GP wurde die Probe für 2 h bei 4 °C auf einem Rotator inkubiert. Die Protein A-gebundenen GP-Antikörper-Komplexe wurden nachfolgend 3x mit 1 ml Co-IP-Puffer (+ Complete) für je 1 min bei 4 000 rpm und 4 °C gewaschen. Danach wurde das Pellet in 30 µl Co-IP-Puffer (+ Complete) resuspendiert und mit 15 µl 4x SDS-Probenpuffer versetzt. Die Analyse des Lysats sowie der IP-Proben erfolgte über SDS-PAGE und Western Blot (4.2.1-2). In Abb. 4.1 ist das Prinzip des OBA noch einmal graphisch dargestellt.

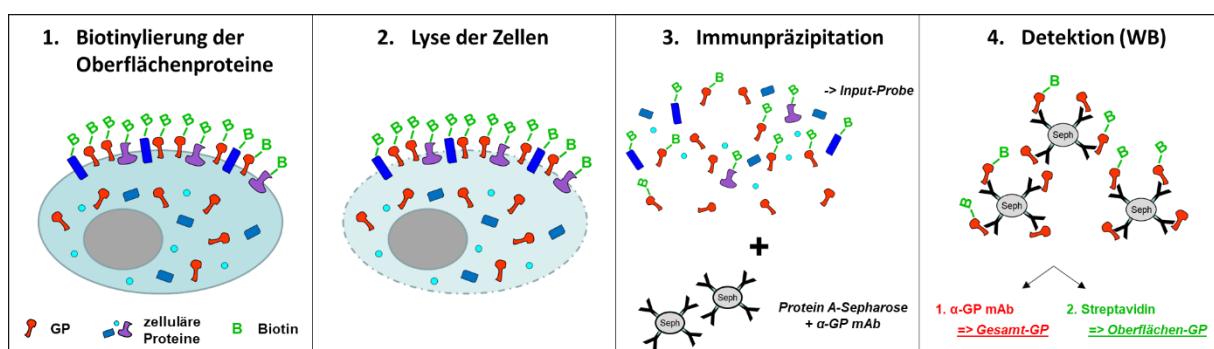


Abb. 4.1: Prinzip des Oberflächenbiotinylierungs-Assays.

#### 4.3.4 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von intrazellulären Proteinen

Die Durchführung der Immunfluoreszenzanalyse (IFA), die die Visualisierung von Proteinen in fixierten Zellen auf der Grundlage von Fluoreszenzreaktionen ermöglicht, wurde grundsätzlich entsprechend der Beschreibung in meiner Bachelorarbeit durchgeführt (Halwe, 2012, Abschnitte 4.2.2 + 4.2.3).

Aufgrund der Bedeutung der Methode für diese Arbeit, sind die einzelnen Schritte dieser Technik hier noch einmal explizit aufgeführt.

Um die intrazelluläre Verteilung von Proteinen zu untersuchen, wurden die auf Deckgläschen ausgesäten Zellen 16 bzw. 24 hpt zunächst mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) in DMEM fixiert. Durch die Fixierung von Zellen werden alle dynamischen Lebensprozesse unmittelbar unterbunden, sodass sich bestimmte Momentaufnahmen zellulärer Vorgänge mikroskopisch untersuchen lassen. Das verwendete Fixativ PFA induziert dabei durch seine Aldehyd-Gruppen eine Kreuzvernetzung der Aminogruppen von Proteinen, die infolge dieser strukturellen Veränderung ihre Funktion verlieren, aber morphologisch weitgehend konserviert bleiben, was die spätere Markierung mit spezifischen Antikörpern ermöglicht. Das Standardprotokoll sah eine Fixierungszeit von 30 min vor, jedoch erwies sich im Falle der infolge der Expression der Myosin V Tail-Mutanten induzierten Bildung perinukleärer Aggregationen eine Fixierungszeit von 48 h als geeigneter, um einen zuverlässigen Zugang der Antikörper zu diesen verdichteten Membran- und Proteinansammlungen zu gewährleisten. Im Falle von aus dem BSL-4 ausgeschleusten Proben wurden die Zellen den SOPs („*Standard Operation Procedures*“) zur Inaktivierung von Filoviren folgend zweimal über Nacht mit 4 % PFA/DMEM fixiert.

Nach der Fixierung wurden die Zellen mit PBS<sub>def</sub> gewaschen und anschließend überschüssiges PFA für 10 min mit 0,1 M Glycin/PBS<sub>def</sub> abgesättigt. Im Anschluss wurden die Zellmembranen durch eine 10-minütige Inkubation in 0.1 % Triton X-100/PBS<sub>def</sub> permeabilisiert, um den Eintritt der Antikörper ins Zellinnere zu ermöglichen. Danach folgte ein weiterer Waschschrift mit PBS<sub>def</sub>, bevor die Zellen für mindestens 10 min in Immunfluoreszenz-Blockierungspuffer (IF-BB) inkubiert wurden. Zur indirekten Immunfluoreszenzfärbung wurden 20 µl des in IF-BB verdünnten 1°-Antikörpers auf einer mit Parafilm beschichteten Platte vorgelegt und die Deckgläschen mit der Zelleseite nach unten für 1 h in diesem 20 µl-Tropfen inkubiert. Um ein Austrocknen sowie eine Abnahme der Fluoreszenzaktivität zu verhindern wurden die Antikörper-Inkubationsschritte in einer feuchten Dunkelkammer durchgeführt. Im Anschluss wurden die ungebundenen Antikörper durch dreimaliges, fünfminütiges Waschen mit PBS<sub>def</sub> entfernt und die Zellen für abermals 1 h in 20 µl des in IF-BB verdünnten, mit einem Fluorochrom gekoppelten 2°-Antikörpers inkubiert. Dem Ansatz wurde in diesem Schritt ggf. zusätzlich 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) in einer Verdünnung von 1:10000 zur Anfärbung der Nuklei beigelegt. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen abschließend mithilfe eines Eindeckmediums (Fluoprep bzw. FluorSave) auf Glas-Objektträgern (76 x 22 mm) montiert.

Alle Bildaufnahmen fixierter Zellen in dieser Arbeit wurden mit dem Konfokalen Laserscanning Mikroskop (KLSM) *Leica TCS SP5 II* und einem *HyD3*-Detektor durchgeführt.



#### 4.3.5 Native indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Oberflächenproteinen

Um eine spezifische Immunfluoreszenzfärbung von auf der Zelloberfläche lokalisierten Proteinen durchzuführen, erfolgte die Färbung mit dem 1°-Antikörper nativ, d.h. vor der Fixierung/Permeabilisierung der Zellen. Bis zur Fixierung wurden alle Schritte bei 4 °C durchgeführt, um die endozytotische Aufnahme von gebundenen AK in die Zelle zu verhindern.

Nach der Abnahme des Kulturmediums wurden die Zellen 1x vorsichtig mit PBS<sup>++</sup> gewaschen, für 1 h mit dem 1°-Antikörper inkubiert, erneut 1x vorsichtig mit PBS<sup>++</sup> gewaschen und anschließend für 20 min in 4 % PFA/DMEM fixiert. Alle weiteren Schritte entsprachen der Färbung von intrazellulären Proteinen (4.3.4).

#### 4.3.6 Antikörper-Aufnahme-Assay

Mithilfe des Antikörper-Aufnahme-Assays sollte untersucht werden, ob Proteine, die bereits an der Zelloberfläche lokalisiert sind, mittels einer Re-Endozytose erneut internalisiert werden. Die hier beschriebene Methode folgt mit geringfügigen Modifikationen einem etablierten Protokoll, mit dem in früheren Studien die Endozytose der NiV-Glykoproteine F und G analysiert wurden (Vogt et al., 2005). Die Technik verbindet eine native Markierung der Oberflächenproteine (s. 4.3.5) mit der temporären Ermöglichung einer Endozytose, bevor die Zellen schließlich fixiert und gefärbt werden. Aufgrund seiner sehr effizienten Endozytose-Aktivität diente in diesem Assay das NiV-F als Positivkontrolle.

Für den Antikörper-Aufnahme-Assay wurden die Zellen 24 hpt zunächst einmal vorsichtig mit 4 °C kaltem PBS<sup>++</sup> gewaschen und anschließend die Oberflächenproteine nativ mit spezifischen Antikörpern (MARV-GP: monoklonaler Maus- $\alpha$ -GP, 50-6-10; NiV-F: Meerschweinchen- $\alpha$ -NiV-Serum), verdünnt in IF-BB, für 45 min bei 4 °C markiert. Darauf folgte erneut ein Waschschr mit PBS<sup>++</sup>, bevor die Zellen entweder für 30 min bei 4 °C (Negativkontrolle, Endozytose blockiert) oder 37 °C (Endozytose möglich) inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen mit 4 % PFA/DMEM fixiert, gewaschen und mit 0,1 M Glycin/PBS<sub>def</sub> abgesättigt. Um eine Differenzierung von internalisierten und an der Oberfläche verbliebenen Proteinen zu ermöglichen, wurden die markierten Oberflächenproteine bereits vor der Permeabilisierung mit einem Alexa Fluor 594-gekoppelten 2°-Antikörper gefärbt, gewaschen und frei gebliebene Bindungsstellen mit einem zweiten, nicht-fluoreszierenden (HRP-gekoppelten) 2°-Antikörper abgesättigt. Im Anschluss erfolgte erneut ein Waschschr, gefolgt von der Permeabilisierung, Blockierung in IF-BB sowie der Färbung der internalisierten Proteine mit einem dritten 2°-Antikörper, in diesem Fall gekoppelt an Alexa Fluor 488. Abschließend erfolgte die Eindeckung mit Fluoprep und die Analyse am KLSM.

Durch die Verwendung in unterschiedlichen Spektren fluoreszierender 2°-Antikörper können mit dieser Technik an der Oberfläche verbliebene und internalisierte Proteine differenziert werden. Dies erlaubt eine Aussage über die jeweilige Endozytose-Aktivität. Abb. 6.3 stellt diese Methode noch einmal graphisch dar.

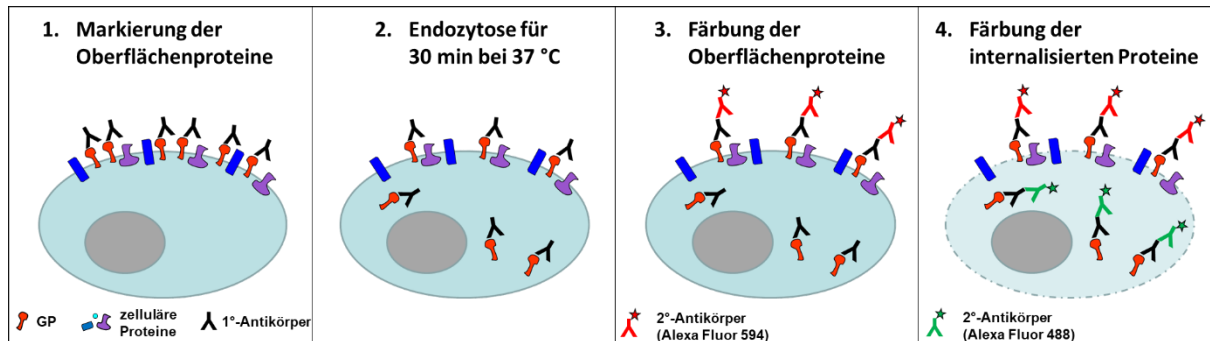


Abb. 4.2: Prinzip des Antikörper-Aufnahme-Assays.

#### 4.3.7 Lebendzellmikroskopie

Durch die Lebendzellmikroskopie können dynamische Transportprozesse in lebenden Zellen verfolgt werden. Da keine Antikörperfärbung wie in 4.3.4-4.3.7 möglich ist, werden allerdings zur Visualisierung autofluoreszierende Proteine benötigt, z.B. rekombinante GFP-gekoppelte Fusionsproteine. Die Zellen wurden dazu in einer  $\mu$ -Slide 4 well ibidi-Platte ausgesät und transfiziert. Nach 20-24 h wurde das Zellkulturmedium mit 1 ml Leibovitz's<sup>+++</sup> ausgetauscht, das einerseits ein CO<sub>2</sub>-unabhängiges Kulturmilieu gewährleistet und andererseits zusätzlich zu Glutamin und Pen/Strep mit 20 % FCS und 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren substituiert wurde, um optimale Nährstoffbedingungen außerhalb des Brutschranks zu gewährleisten (s. Schudt et al., 2013; 2015; Takamatsu et al., 2018). Die Aufnahmen erfolgten am Lebendzellmikroskop Nikon TE2000-E.

#### 4.3.8 siRNA-vermittelte Depletion von zellulären Proteinen

Mithilfe der sog. RNA-Interferenz kann die Expression von zellulären Proteinen herunterreguliert werden. Die Depletion basiert dabei auf der Transfektion von Zellen mit spezifischen „*small interfering RNAs*“ (siRNAs), die die komplementäre mRNA des Zielproteins binden und ihre Degradation durch den „*RNA-induced silencing complex*“ (RISC) vermitteln.

In dieser Arbeit wurde eine Mischung aus vier kommerziellen siRNAs der Firma Dharmacon („*SMARTpool On-TARGETplus Human Rab11A siRNA*“) eingesetzt, um das endogene Rab11 zu depletieren. Dazu wurden eine entsprechende Menge der siRNAs für eine Endkonzentration von 33 nM zunächst gemeinsam mit 5  $\mu$ l (6 well) bzw. 1.67  $\mu$ l (24 well) des Transfektionsreagenzes DharmaFECT 1 (Dharmacon) in Opti-MEM für 20 min inkubiert. Anschließend wurde das

Zellkulturmedium abgenommen und durch DMEM<sup>+++ (3%)</sup> ersetzt, bevor die Transfektionskomplexe hinzugefügt wurden. Die Zellen wurden für 24 h inkubiert, bevor eine zweite Transfektion mit Plasmid-DNA (s. 4.3.1) erfolgte. Nach 48 h (bzw. 24 h nach Plasmid-DNA-Transfektion) wurden die Zellen schließlich für eine Western Blot-Analyse geerntet (4.3.2 bzw. eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt (4.3.4).

#### 4.3.9 Monensin-Behandlung zur Blockierung des Transports aus dem Golgi-Apparat

Mit dem Polyether-Antibiotikum Monensin lässt sich spezifisch die Sekretion am medialen und *trans*-Golgi-Komplex blockieren, wodurch der Abtransport von Proteinen aus dem Golgi-Apparat inhibiert werden kann (Mollenhauer et al., 1990). Die Zellen wurden dazu zunächst wie in 4.3.1 beschrieben transfiziert. Im Zuge des Mediumwechsels nach 4 h wurde dem Zellkulturmedium das in Methanol gelöste Monensin in einer Endkonzentration von 10 µM hinzugefügt und die Zellen weitere 20 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung wie in 4.3.4 beschrieben. Kontrollzellen wurden mit einer entsprechenden Menge Methanol behandelt.

### 4.4 Virologische Methoden

Da es sich beim MARV um ein hochpathogenes Virus der Biologischen Sicherheitsstufe 4 (BSL-4) handelt, wurden alle Experimente mit infektiösen Viren unter BSL-4-Bedingungen am Institut für Virologie in Marburg durchgeführt.

#### 4.4.1 Marburg Virus-Anzucht

Zu Beginn der Arbeiten im BSL-4-Labor wurde ein MARV-Stock angelegt, der für alle hier beschriebenen Experimente verwendet wurde.

Dafür wurde initial eine MARV-infizierte Vorkultur hergestellt, indem subkonfluente VeroE6-Zellen in einer T25-Zellkulturflasche mit MARV bei einer „*Multiplicity of Infection*“ (MOI = Anzahl der Viren / Anzahl der Zellen) von 0,1 „*plaque forming units*“ (PFU) infiziert wurden. Nach 4 Tagen wurde der Überstand abgenommen und im Anschluss an einen Zentrifugationsschritt zur Pelletierung von Zelltrümmern (10 min, 2500 rpm) 1:20 in DMEM<sup>++ (0%)</sup> verdünnt. Jeweils 10 ml dieser verdünnten Vorkultur wurden schließlich auf mehrere T175-Flaschen mit subkonfluent ausgesäten VeroE6-Zellen verteilt. 7 Tage nach der Infektion wurden erneut die Überstände geerntet und Zelltrümmer durch einen Zentrifugationsschritt (10 min, 2500 rpm) entfernt. Ein Teil dieses gereinigten Zellkulturüberstands wurde in Cryo-Röhrchen überführt und bei -80 °C gelagert, während ein anderer

Teil zur weiteren Ankonzentration und Aufreinigung der Viren auf SW32-UZ-Röhrchen verteilt und mit einem 20 %-igen Sucrose-Kissen unterschichtet wurde. Darauf folgte eine Ultrazentrifugation für 2 h bei 25.000 rpm und 4 °C, bevor der Überstand verworfen und die Viruspellets in je 200 µl PBS<sub>def</sub> aufgenommen wurden. Die entstandenen Virussuspensionen wurden anschließend zusammengeführt, aliquotiert und in Cryo-Röhrchen bei -80 °C bzw. in flüssigem Stickstoff gelagert. Der Titer der Viren wurde mittels Immuno-Plaque- bzw. TCID<sub>50</sub>-Assay bestimmt (4.4.3-4.4.4). Zur Kontrolle wurde weiterhin virale RNA mit dem *QIAamp® Viral RNA Mini Kit* isoliert, durch eine RT-PCR (*Omniscript® Reverse Transcription Kit*) in DNA transkribiert und anschließend mittels Sequenzierung überprüft.

#### 4.4.2 Marburg Virus-Infektion

In dieser Arbeit wurden auf Deckgläschen ausgesäte humane Hepatokarzinomzellen (HuH7) mit dem MARV infiziert, um die Verteilung von viralen Proteinen mittels Immunfluoreszenzanalyse zu untersuchen. Da sich durch Vorversuche ergeben hat, dass eine parallele Transfektion mit Plasmid-DNA (z.B. zur Expression GFP-gekoppelter zellulärer Proteine) am effizientesten verläuft, wenn die Plasmid-DNA 4 h vor der Infektion hinzugegeben wird, wurden subkonfluente HuH7-Zellen zunächst im Vollmedium (DMEM<sup>+++</sup>(10%)) transfiziert. Nach 4 h wurde das MARV im Infektionsmedium (DMEM<sup>++</sup>(0%)) verdünnt und das Transfektionsmedium durch das Inokulum ersetzt. Die Infektion erfolgte dabei stets mit einer MOI von 1 PFU. 24 sowie nochmals 48 h *post infectionem* (hpi) wurden die Zellen entsprechend der SOP für die Inaktivierung von Filoviren jeweils über Nacht mit 4 % PFA/DMEM fixiert und die Viren damit inaktiviert. Die Platten mit den Deckgläschen wurde anschließend entsprechend der SOP für das Ausschleusen von Proben aus dem BSL-4-Labor ausgeschleust und anschließend wie unter 4.3.4 beschrieben weiter verarbeitet.

#### 4.4.3 Immuno-Plaque-Assay

Der Immuno-Plaque-Assay ist eine Technik zur Bestimmung des Virustiters in einer Probe. Die Methode basiert auf der Ausbreitung eines replizierenden Virus in der Zellkultur, die durch die Verwendung eines speziellen Polymer-Mediums (hier CMC) lokal begrenzt wird und in der Folge zur Ausbildung spezifischer Infektionsherde bzw. Plaques führt. Ein Plaque steht dabei theoretisch für ein einzelnes infektiöses Partikel. Zur Visualisierung wurden die viralen Protein in den Plaques mit einem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper gefärbt.

Für den Plaque-Assay wurden konfluente VeroE6-Zellen in einer 24-well-Platte mit verschiedenen Virusverdünnungen ( $10^{-2}$  -  $10^{-7}$  in 500 µl DMEM<sup>++</sup>(0%)) für 1 h bei 37 °C infiziert. Anschließend wurde eine 2 %-ige CMC-Lösung durch die 1:1-Mischung von 4 % CMC und MEM<sup>++</sup>(4%) hergestellt, das

Inokulum durch 500 µl der 2 % CMC/MEM-Lösung ausgetauscht und für 3 Tage bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen wie unter 4.4.2 beschrieben 2x mit 4 % PFA/DMEM fixiert, aus dem BSL-4-Labor ausgeschleust und für eine intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung vorbereitet (4.3.4). Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte mithilfe eines α-MARV-Serum aus der Ziege sowie eines Esel-α-Ziege-Sekundärantikörpers, gekoppelt an Alexa Fluor 488. Die Auszählung der Plaques erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. Zur Kalkulierung des Titers wurde die Anzahl an Plaques mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert und als PFU/ml angegeben.

#### 4.4.4 „Tissue Culture Infectious Dose 50“ (TCID<sub>50</sub>)-Assay

Neben dem Immuno-Plaque-Assay kann der Virustiter in einer Probe auch mit dem TCID<sub>50</sub>-Assay bestimmt werden. Bei diesem Test wird der sog. zytopathische Effekt (CPE), d.h. mit der Virusinfektion einhergehende toxische Effekte auf die Zellen, als Messparameter bestimmt und so kalkuliert, welche Anzahl an Viren benötigt wird, um einen CPE in 50 % der Zellen hervorzurufen. Der CPE äußert sich durch Abrunden oder Ablösen der Zellen und kann am Lichtmikroskop beobachtet werden.

Für den TCID<sub>50</sub>-Assay wurden VeroE6-Zellen zu einer Konfluenz von etwa 30-40 % in einer 96-well-Platte ausgesät und mit verschiedenen Virusverdünnungen ( $10^{-3}$  -  $10^{-10}$ ) in Quadruplikaten infiziert und für 10 Tage inkubiert. Nach 3, 7 und final nach 10 Tagen wurde die Ausprägung des CPE mit einem Lichtmikroskop kontrolliert und anschließend der Titer nach der Methode von Spearman und Kärber berechnet (Ramakrishnan, 2016).

### 4.5 Quantifizierung von Immunfluoreszenz-Daten

Mikroskopische Aufnahmen von Immunfluoreszenz-Färbungen eignen sich sehr gut, um intrazelluläre Verteilungen oder Kollokalisierungen von Proteinen zu visualisieren. Allerdings beinhalten diese Bilder auch viele quantifizierbare Daten, die optische Eindrücke bestätigen (oder auch widerlegen) und damit die Interpretation auf ein breiteres Fundament stellen können. In dieser Arbeit wurde daher die qualitative optische Analyse, soweit möglich und sinnvoll, mit einer quantitativen Analyse verbunden. In den nächsten Unterpunkten soll auf die Methoden, die zur Quantifizierung von Immunfluoreszenzdaten verwendet wurden, näher eingegangen werden. Alle Analysen wurden mit der Software ImageJ/Fiji durchgeführt (Schindelin et al., 2012).

#### 4.5.1 Pearson's Korrelationskoeffizient (*Pixel-basierte Kolokalisationsanalyse*)

Kolokalisation bezeichnet das Auftreten von zwei unterschiedlichen Proteinen an demselben Ort in der Zelle. Mithilfe einer Markierung mit fluoreszierenden Farbstoffen können die einzelnen Proteine durch ein Fluoreszenz-Mikroskops detektiert und in ein digitales Bild umgewandelt werden. In diesem Bild erscheint eine Kolokalisation daher schließlich als überlappende Pixel in zwei oder mehr unterschiedlichen Kanälen, die optisch zu einer Mischung der zugeordneten Farben führt (z.B. grün + rot = gelb). Jedem dieser Pixel ist dabei ein Intensitätswert zugeordnet, der bei einem 8 bit-Bild zwischen 0 und 255 betragen kann. Eine Möglichkeit zur Quantifizierung von Kolokalisation ist daher zu messen, ob die Intensitätswerte der einzelnen Pixel in zwei Kanälen korrelieren. Unter den verschiedenen Methoden von Pixel-basierten Quantifizierungstechniken ist dabei die Kalkulation von Pearson's Korrelationskoeffizienten (PCC) eine weit verbreitete Methode (Bolte und Cordelières, 2006; Dunn et al., 2011). Mit dem PCC wird überprüft, ob die Pixelintensitäten zweier Kanäle in einem linearen Verhältnis zueinander stehen. Der PCC kann Werte zwischen -1 und +1 annehmen, wobei +1 für eine vollständige positive Korrelation (absolute Überlagerung), -1 für eine vollständige negative Korrelation (absoluter Ausschluss) und 0 für keine bzw. zufällige Korrelation steht (Bolte und Cordelières, 2006; Dunn et al., 2011). Die Berechnung des PCC wurde an originalen konfokalen Bildern ohne vorherige Prozessierung mit dem in der Basisversion von ImageJ/Fiji enthaltenen Plugin Coloc2 durchgeführt. Zusätzlich zur simplen Berechnung des PCC wurden die Bilder dabei nach dem Ansatz von Costes einerseits einer Grenzwertanalyse unterzogen, um eine Beeinträchtigung des Ergebnisses durch Hintergrundsignale zu reduzieren, und andererseits ein p-Wert berechnet, der durch 100 randomisierte Anordnungen der Pixel die statistische Signifikanz des PCC evaluiert (Costes et al., 2004). Nur Bilder, deren PCC auch eine statistische Signifikanz nach Costes ( $p > 0,95$ ) besaßen, wurden für die Analyse verwendet. Außerdem wurden in jedem Bild die Zellgrenzen mithilfe der Auswahl-Werkzeuge in ImageJ/Fiji manuell definiert und die Analyse auf diese Bildregion begrenzt.

Die Berechnung des PCC kam in dieser Arbeit in den Abbildungen 5.1 und 5.4 zum Einsatz.

#### 4.5.2 Objekt-basierte Kolokalisationsanalyse

Eine Objekt-basierte Analyse ist eine weitere Möglichkeit zur Quantifizierung von Kolokalisation, die sich insbesondere dann eignet, wenn die Größe und Form der zu untersuchenden Strukturen bekannt sind und sie sich als definierte Objekte leicht vom Hintergrund unterscheiden lassen. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Natur der Analyseobjekte als biologische Strukturen beibehalten wird und diese nicht in einzelne Pixel unterteilt werden (Bolte und Cordelières, 2006).

Zu Beginn der Objekt-basierten Analyse steht stets die Segmentierung der Analyseobjekte, also die Separation der Zielstrukturen vom Hintergrund bzw. von anderen Strukturen, die nicht Teil der Analyse

sein sollen (Bolte und Cordelières, 2006). Nach der Segmentierung folgt die eigentliche Kolokalisationsanalyse, die in dieser Arbeit entweder mithilfe des ImageJ/Fiji-Plugins *JACoP* („*Just Another Colocalisation Plugin*“, Bolte und Cordelières, 2006) oder durch die rein prozentuale Berechnung der Objektüberlappung durchgeführt wurde. In beiden Fällen wurden jeweils die Zellgrenzen mithilfe der Auswahl-Werkzeuge in ImageJ/Fiji manuell definiert und die Analyse auf diese Bildregion begrenzt.

In Abb. 5.5 wurden die Bilder zur Segmentierung der Objekte folgenden Prozessierungsschritten unterzogen: 1) Hintergrund-Subtraktion mit dem „*Rolling Ball*“-Algorithmus (Radius 10), 2) Auto Threshold (Methode „*Moments*“), 3) Median-Filter (Radius 1). Die segmentierten Bilder wurden schließlich mit dem Plugin *JACoP* und einer Objekt-basierten Methode ausgewertet, bei der geprüft wird, ob die geometrischen Zentren der Objekte des ersten Kanals innerhalb der Objekte des zweiten Kanals lokalisiert sind („*Colocalization based on geometrical centres-particles coincidence*“). Bei der Analyse wurden die GP-Objekte als Partikel definiert und geprüft, ob sie mit den geometrischen Zentren der GFP-Rab11- bzw. VP40-Objekte kolokalisieren.

Da es sich bei den Myosin V Tail-Objekte in Abb. 5.10 um relativ große und klar definierte Strukturen handelte, wurde hier überprüft, wie viele dieser Aggregate mindestens eine Überlappung von 50 % mit GP-Objekten zeigen. Da der Fokus hierbei auf den großen Myosin V-Aggregaten lag, wurden die Objekte zusätzlich anhand ihrer Größe segmentiert und eine Mindestgröße von  $0,25 \mu\text{m}^2$  definiert. Die Segmentierung der Objekte wurde mittels folgender Prozessierungsschritte durchgeführt: 1) Auto Threshold (Methode „*Intermodes*“) für den Myosin V-Kanal bzw. Auto Local Threshold (Methode „*Contrast*“, Radius 15), 2) Medianfilter (Radius 1), 3) Watershed, 4) Analyze Particles (Size =  $0,25 \mu\text{m}^2$  - Infinity). Für die Quantifizierung wurde eine Kolokalisation definiert als eine Objekt-Überlappung von mindestens 50 % der Fläche.

Diese Methode wurde in einer weiteren Studie mit vergleichbaren Prozessierungsschritten verwendet, um die Kolokalisation von NiV-M bzw.  $\gamma$ -Tubulin in NiV „*Inclusion Bodies*“ zu quantifizieren (Ringel, Heiner, Behner, Halwe et al., 2019).

### 4.5.3 Intensitätsmessungen von Immunfluoreszenz-Daten

Zur Quantifizierung der Oberflächenexpression von MARV-GP wurden in den Abbildungen 5.13 und 5.15 die Pixel-Intensitäten im Oberflächen- sowie im Gesamt-GP-Kanal gemessen und miteinander ins Verhältnis gesetzt. Um die variable Größe der Zellen zu berücksichtigen, wurde bei der Messung jeweils die „*Integrated Density*“, also die Pixel-Intensität x Fläche, gemessen. Die Messung erfolgte entweder mit der Standard-Messfunktion von ImageJ/Fiji (Abb. 5.13) oder dreidimensional mithilfe des „*3D*



*Suite*“-Plugins (Ollion et al., 2013). Die Zellgrenzen wurden auch hier mithilfe der Auswahl-Werkzeuge in ImageJ/Fiji manuell definiert und die Analyse auf diese Bildregion begrenzt.

#### 4.6 Statistische Methoden

Die quantitativen Analysen in dieser Arbeit bilden jeweils den Mittelwert inklusive Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten ab. Im Falle der Einzelzellanalysen von konfokalmikroskopischen Bildern ist zudem die Anzahl der analysierten Zellen angegeben. Um zu ermitteln, ob sich die Werte der verschiedenen Proben statistisch signifikant voneinander unterscheiden, wurden die unten genannten statistischen Tests angewandt. Die Berechnung erfolgte mit der Software *GraphPad Prism*. Zusätzlich zur Signifikanzanalyse wurden alle Gruppen auf eine Normalverteilung (Anderson-Darling-Test) sowie auf eine Homogenität der Varianzen (Brown-Forsythe-Test, Bartlett-Test) geprüft.

Waren die Voraussetzungen für einen 1-Weg ANOVA gegeben (mehrere Stichproben, Normalverteilung, Varianzhomogenität) wurde dieser Test gewählt. Gruppen mit mehreren Stichproben, die die Voraussetzungen der Normalverteilung bzw. Varianzhomogenität nicht erfüllten, wurden einem nicht-parametrischen Test (Kruskal-Wallis-Test) unterzogen. Für Experimente, in denen eine Probe auf 100 % gesetzt wurde und alle weiteren Gruppen mit dieser Kontrollprobe verglichen wurden, erfolgte die Analyse mithilfe von Student's t-Test mit Welch-Korrektur.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Analyse der subzellulären Lokalisation des Marburg Virus Glykoproteins

Zur Charakterisierung der intrazellulären Lokalisation von MARV-GP wurden im ersten Teil dieser Arbeit umfassende (konfokal-) mikroskopische Studien durchgeführt. Dies beinhaltete vergleichende quantitative Analysen a) der Kolo­kalisation von GP mit verschiedenen endosomalen Markerproteinen sowie b) des Einflusses der Anwesenheit des Matrixproteins VP40 auf die Lokalisation von GP und der Markerproteine. Im Fokus dieser Untersuchungen stand dabei insbesondere zu prüfen, ob sich eine stärkere Assoziation von GP und RE im Vergleich zu frühen bzw. späten Endosomen beobachten lässt. Die Versuche wurden zunächst in transient transfizierten Zellen durchgeführt, bevor die Ergebnisse mit der Situation in MARV-infizierten Zellen verglichen wurden. Als Zellmodell wurden für diese Studien humane Hepatokarzinom-Zellen der Linie HuH7 ausgewählt, da sie einerseits hepatischen Ursprungs und damit wichtige Zielzellen des MARV sind und andererseits ein bereits gut etabliertes Modell für die Infektion mit Filoviren darstellen (Kuhn, 2008; Mehedi et al., 2011b; Logue et al., 2019). Des Weiteren eignet sich diese Zelllinie aufgrund ihrer relativ flachen Morphologie besonders gut für mikroskopische Studien (s. Schudt et al., 2013; 2015; Takamatsu et al., 2018). Um eine höchstmögliche Auflösung und Spezifität der mikroskopischen Bilder zu gewährleisten, wurde, soweit nicht explizit anders angegeben, für alle Aufnahmen in dieser Arbeit ein konfokales Laser Scanning-Mikroskop (Leica SP5) verwendet.

#### 5.1.1 Komparative Kolo­kalisationsanalyse des Marburg Virus-Glykoproteins und endosomalen Markerproteinen in transient transfizierten Zellen

Um die genaue intrazelluläre Lokalisation von MARV-GP sowie dessen Assoziation mit verschiedenen endosomalen Subpopulationen zu charakterisieren, wurden zunächst fluoreszenzmikroskopische Kolo­kalisationsstudien von GP und zellulären Markerproteinen in HuH7-Zellen durchgeführt, die das MARV-GP plasmidbasiert transient exprimierten. Um eine möglichst große Bandbreite an Markern für verschiedene Endosomen abzudecken, wurden sowohl diverse endogene Proteine mittels indirekter Antikörperfärbung markiert als auch gut beschriebene, mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) markierte Proteine über entsprechende Plasmide koexprimiert. Einen Überblick über die untersuchten zellulären Marker sowie deren zugehörigen endosomalen Lokalisation gibt Tabelle 5.1.

**Tabelle 5.1****Überblick der für die Kolokalisationsanalysen verwendeten endosomalen Markerproteine**

Endosomaler Marker	Lokalisation	Detektion
EEA1	frühes Endosom [1]	endogen ( <i>Antikörperfärbung</i> )
LAMP1	spätes Endosom / Lysosom [2]	endogen ( <i>Antikörperfärbung</i> )
LAMP2	spätes Endosom / Lysosom [2]	endogen ( <i>Antikörperfärbung</i> )
TfR	frühes / Recycling Endosom [3]	endogen ( <i>Antikörperfärbung</i> )
Rab5	frühes Endosom [4]	GFP-Fusionsprotein
Rab9	spätes Endosom [5]	GFP-Fusionsprotein
Rab11	Recycling Endosom [6]	GFP-Fusionsprotein

Referenzen:

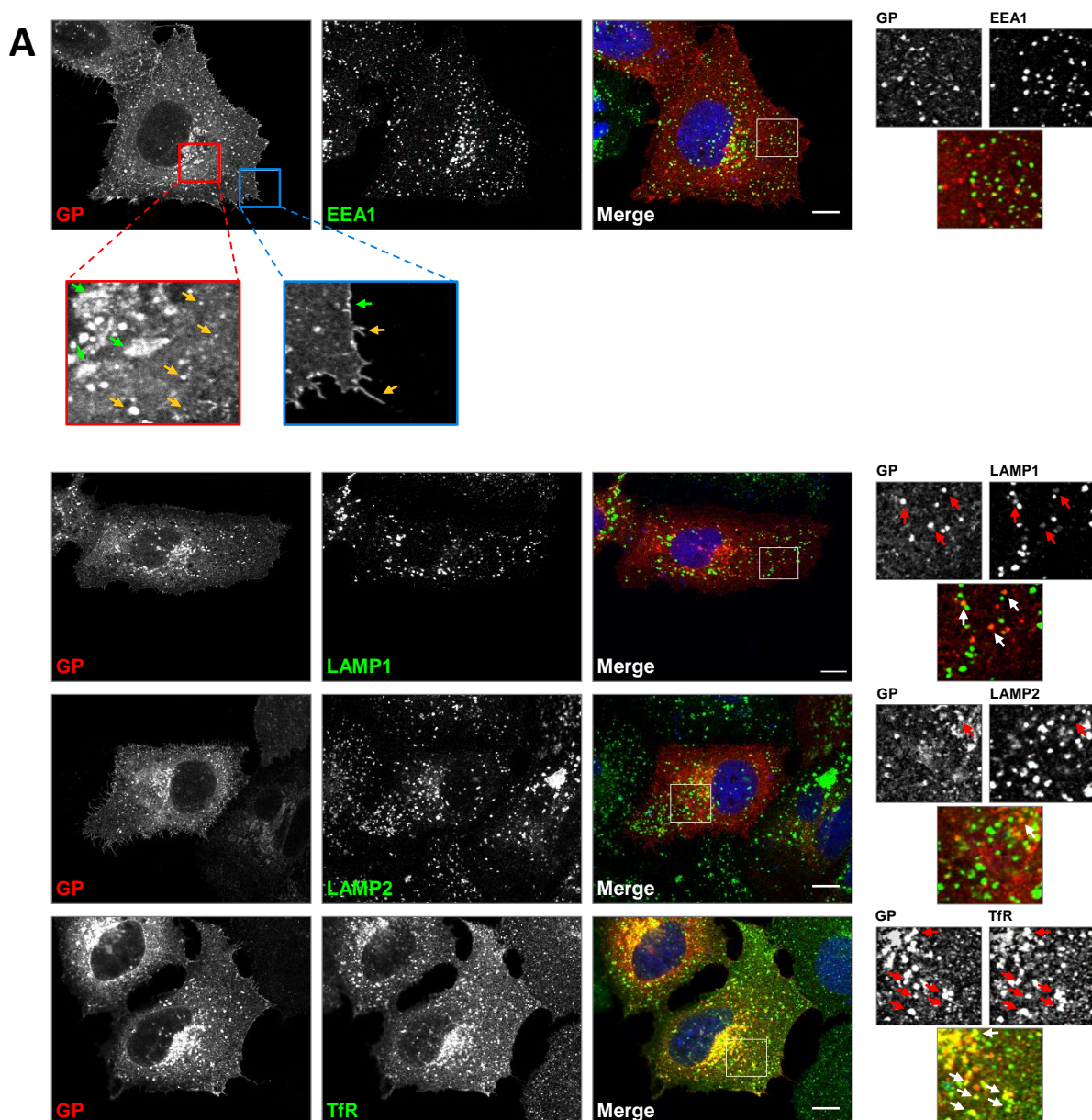
- |                          |                            |
|--------------------------|----------------------------|
| 1 - Mu et al. (1995)     | 4 - Bucci et al. (1992)    |
| 2 - Fukuda et al. (1991) | 5 - Lombardi et al. (1993) |
| 3 - Mayle et al. (2012)  | 6 - Ullrich et al. (1996)  |

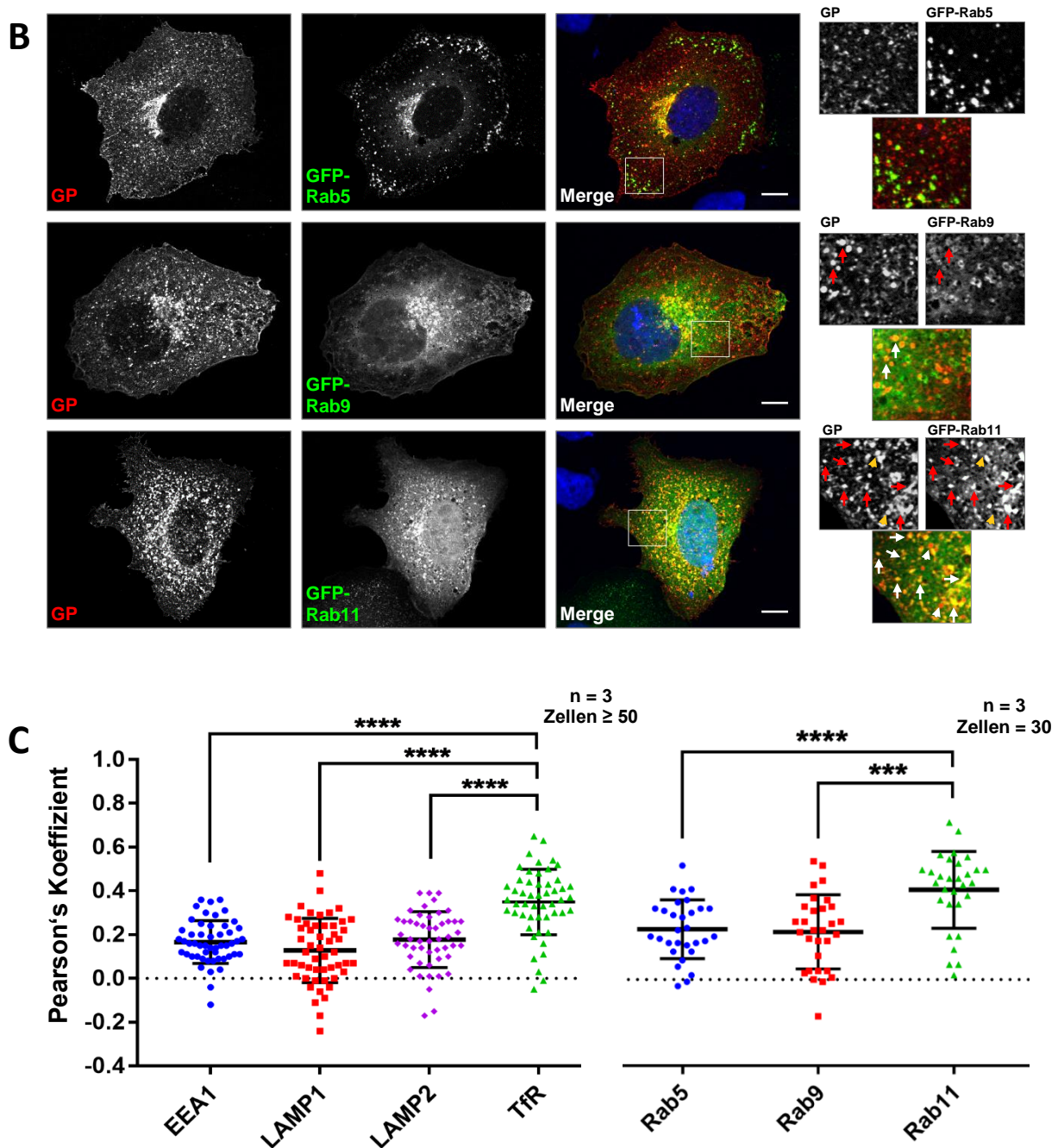
Für die Kolokalisationsanalyse wurden subkonfluente HuH7-Zellen zunächst mit für MARV-GP kodierenden Plasmidvektoren transfiziert. Im Falle einer Koexpression mit GFP-gekoppelten Fusionsproteinen wurden diese zusätzlich gemeinsam mit den GP-Plasmiden transfiziert. Für die endogenen Färbungen wurden die Zellen nach 16 h fixiert, permeabilisiert und anschließend durch indirekte Antikörperfärbung mit einem Fluorochrom markiert. Im Falle der Koexpression der GFP-gekoppelten Rab-GTPasen erfolgten diese Schritte 24 h *post transfectionem* (hpt).

In Abb. 5.1 A sind konfokale Aufnahmen von GP-exprimierenden Zellen gezeigt, die ein repräsentatives Bild der beobachteten Kolokalisationsereignisse abbilden. Zur besseren Visualisierung der zum Teil sehr feinen Strukturen ist zudem in jeder Zelle ein Ausschnitt hervorgehoben (weißes Rechteck im „Merge“-Bild), der auf der rechten Seite in vergrößerter Form dargestellt ist. Diese Ausschnitte wurden bewusst so gewählt, dass sie möglichst nicht in direkter Nähe zum Nukleus (viele ER- und Golgi-Stapel) bzw. dem Zellrand liegen, damit ein möglichst breites Bild von intrazellulären Strukturen und potentiellen Transportvesikeln zu erkennen ist. Im obersten Panel sind zudem zwei weitere Bereiche der GP-Färbung herausgestellt, anhand derer zu Beginn die standardmäßige Verteilung von MARV-GP erläutert werden soll (GP+EEA1, links, rotes bzw. blaues Rechteck). Auch wenn die Verteilung von MARV-GP durchaus variieren kann, können im überwiegenden Teil der Zellen folgende Charakteristika beobachtet werden: **a)** geringfügige bis moderate perinukleäre Akkumulationen, die vermutlich ER-

oder Golgi-assoziiertes GP darstellen (roter Kasten, grüne Pfeile), **b)** meist sphärische Strukturen unterschiedlicher Größe in Form von Transportvesikeln zwischen der perinukleären Region und der PM (roter Kasten, goldene Pfeile), **c)** eine deutlich erkennbare Färbung der Zellgrenzen (blauer Kasten, grüner Pfeil) inklusive zellulärer Protrusionen (blauer Kasten, goldene Pfeile) durch an der Oberfläche lokalisiertes GP.

Betrachtet man nun die Überlagerung der GP-spezifischen Signale mit denen der endosomalen Markerproteine fällt auf, dass insbesondere die beiden mit RE assoziierten Markerproteine, der Transferrin-Rezeptor (TfR) sowie GFP-Rab11, eine starke Kolokalisation mit MARV-GP aufweisen. Diese Kolokalisation scheint zudem in verschiedenen zellulären Strukturen aufzutreten und umschließt sowohl sehr kleine, sphärische als auch größere, teilweise mehr tubulär erscheinende Strukturen (gekennzeichnet durch rote Pfeile). Insbesondere im Falle von GFP-Rab11 fällt jedoch noch eine





**Abb. 5.1: MARV-GP kolokalisiert mit den Recycling Endosom-Markern TfR und Rab11.**

**(A)** IFA der Lokalisation von MARV-GP und endogenen endosomalen Markerproteinen. Subkonfluente HuH7-Zellen wurden mit pCAGGS-MARV-GP transfiziert und 16 hpt mit 4 % PFA fixiert und permeabilisiert. Anschließend erfolgte eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit einem polyklonalen Kaninchen- $\alpha$ -MARV-GP IgG-Primärantikörper (0303-007, ibt) in Kombination mit einem Alexa Fluor 594-gekoppelten Ziege- $\alpha$ -Kaninchen IgG-Serum. Die endogenen zellulären Proteine wurden jeweils mit spezifischen monoklonalen Antikörpern aus der Maus sowie einem Alexa Fluor 647-gekoppelten IgG-Serum gefärbt, während die Detektion der Nuclei über die Zugabe von DAPI erreicht wurde. Dargestellt sind repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Experimenten. Weiß umrahmte Bereiche sind auf der rechten Seite vergrößert dargestellt, Pfeile deuten hier auf kolokalisierende Strukturen von GP und endosomalen Markerproteinen. Im obersten Panel (GP+EEA1) sind zudem weitere Bereiche im GP-Kanal hervorgehoben, die eine Standardverteilung von GP abbilden. Der blau umrahmte, vergrößerte Bereich zeigt peripher lokalisiertes GP an der PM (grüne Pfeile) und zellulären Protrusionen (goldene Pfeile). Der rot umrahmte, vergrößerte Bereich deutet auf intrazelluläres GP in perinukleären Strukturen (grüne Pfeile) sowie sphärischen Transportvesikeln verschiedener Größe (goldene Pfeile). **(B)** IFA der Lokalisation von MARV-GP und endosomalen Rab-GTPasen. Subkonfluente HuH7-Zellen wurden mit pCAGGS-MARV-GP sowie pEGFP-Rab5, pEGFP-Rab9 bzw. pEGFP-Rab11 transfiziert und 24 hpt mit 4 % PFA fixiert und permeabilisiert. Anschließend erfolgte eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit einem monoklonalen Maus- $\alpha$ -MARV-GP IgG (31-11-9) in Kombination mit einem Alexa Fluor 594-gekoppelten Ziege- $\alpha$ -Maus IgG-Serum. Die Nuclei wurden mithilfe von DAPI angefärbt. Dargestellt sind repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Experimenten. Weiß umrahmte Bereiche in (A) und (B) sind auf der rechten Seite vergrößert



dargestellt. Pfeile deuten auf kolokalisierende Strukturen von GP und endosomalen Rab-GTPasen. **(C) Quantitative Analyse der Kolokalisation.** Zur Quantifizierung des Ausmaßes der Kolokalisation zwischen GP und den endosomalen Markerproteinen wurde der PCC für  $\geq 50$  Zellen (endogene Marker) bzw. 30 Zellen (Rab-GTPasen) aus jeweils drei unabhängigen Experimenten kalkuliert. Geometrische Symbole repräsentieren den PCC einer einzelnen analysierten Zelle, während die Balken jeweils den Mittelwert inklusive Standardabweichung angeben. Die statistische Analyse erfolgte mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests. \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ . Maßstabsbalken =  $10 \mu\text{m}$ .

weitere Population von größeren GP-positiven Vesikeln mit klar sphärischer Morphologie auf, die keine Kolokalisation mit GFP-Rab11 zeigen (goldene Pfeilköpfe). Im Gegensatz zu den beiden RE-Markern kann im Falle der Markerproteine von frühen Endosomen (EEA1 und GFP-Rab5) bzw. späten Endosomen und Lysosomen (LAMP1/2, GFP-Rab9) nur eine geringe Kolokalisation mit GP festgestellt werden. Interessant ist jedoch, dass die oben angesprochenen großen, sphärischen Vesikel, die keine Assoziation mit GFP-Rab11 zeigen, häufig von GFP-Rab9 umrandet waren und teilweise auch mit LAMP1 bzw. LAMP2 überlagerten (rote Pfeile). Da diese Vesikelpopulation in verschiedener Anzahl und teilweise auch stark vergrößert beobachtet wurde und Rab9 sowie LAMP1/2 das degradative spätendosomale/lysosomale Kompartiment kennzeichnen, könnte es sich dabei potentiell um überschüssiges GP handeln, das von der Zelle zum Abbau vorgesehen ist.

Um die hier angestellten Beobachtungen zu untermauern, wurden die Daten zusätzlich einer quantitativen Analyse unterzogen. Ein Verfahren zur Untersuchung von Kolokalisation in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen ist die Kalkulation von Pearson's Korrelationskoeffizienten (PCC, s. 4.5.1), einer Pixel-basierten Quantifizierungsmethode, mit der die Korrelation einzelner Pixel-Intensitäten in zwei zu vergleichenden Kanälen bestimmt wird. Das Ausmaß dieser Korrelation auf Pixelebene lässt sich infolgedessen als Näherungswert für das tatsächliche Ausmaß der Kolokalisation zweier Fluoreszenzsignale und damit der untersuchten Proteine interpretieren (Dunn et al., 2011). Der PCC kann dabei Werte zwischen 1 (totale positive Korrelation), 0 (keine bzw. zufällige Korrelation) und -1 (totale negative Korrelation bzw. Exklusion) annehmen. Aufgrund des leicht unterschiedlichen experimentellen Hintergrunds der Färbungen (endogen / GFP-gekoppelt, Fixierung 16 / 24 hpt) wurden die PCC-Werte nur innerhalb der jeweiligen Gruppen verglichen (Abb. 5.1 C).

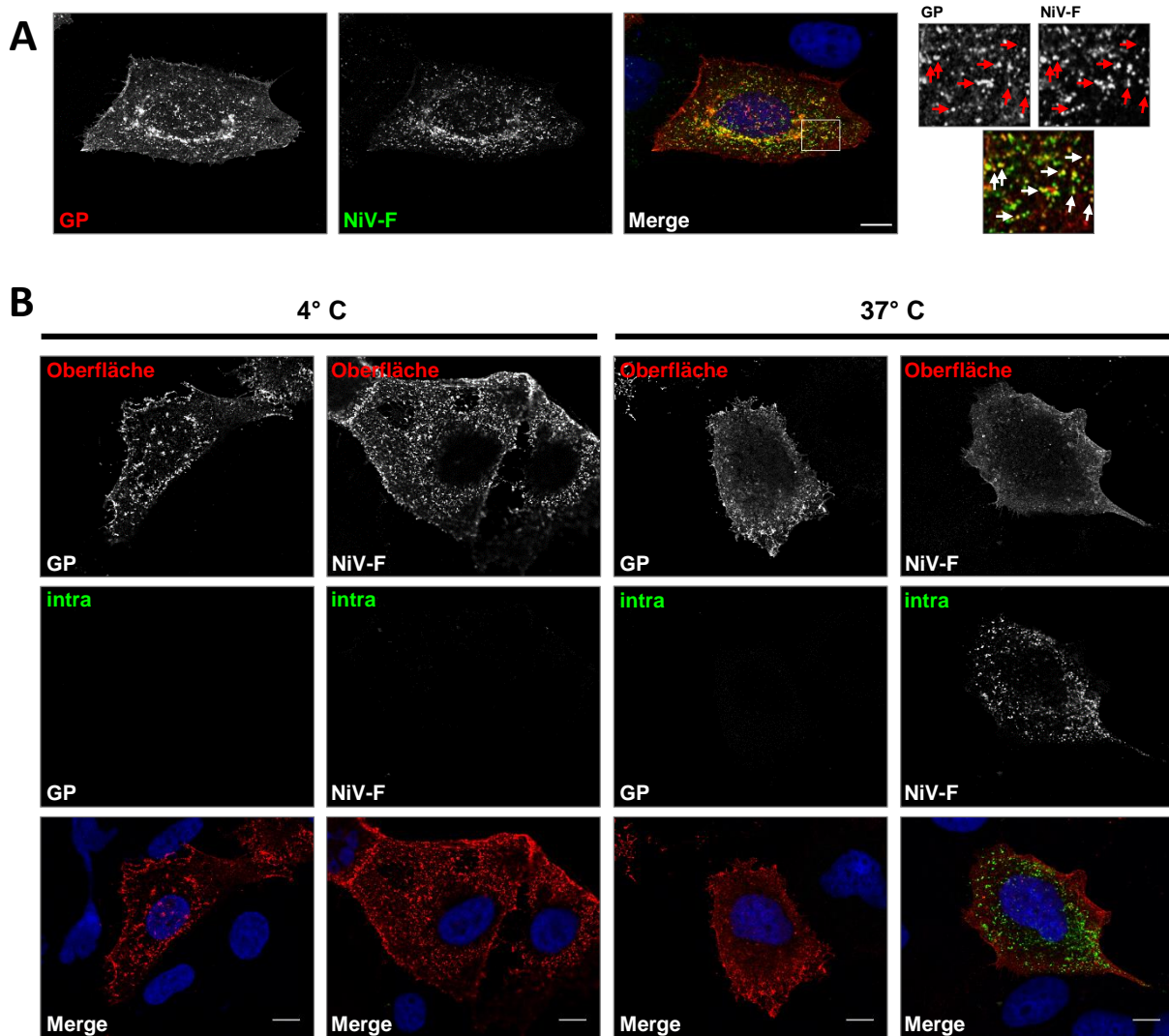
Vergleicht man die berechneten PCC-Werte als Maß für die Korrelation der endosomalen Markerproteine mit MARV-GP, bestätigen sich die visuellen Beobachtungen. In den beiden Gruppen zeigen jeweils der TfR bzw. GFP-Rab11 im Vergleich mit den anderen Faktoren signifikant erhöhte PCC-Werte, was auf eine höhere Assoziation von MARV-GP mit RE als mit frühen bzw. späten Endosomen hinweist. Die Mittelwerte lagen dabei im Falle der beiden Recycling-Marker in einem ähnlichen Bereich von ca. 0.4, was zwar einen signifikanten Unterschied zu den anderen endosomalen Markern bedeutet, aber dennoch weit von einer totalen Korrelation entfernt ist. Dies deutet darauf hin, dass das GP neben diesen überlappenden Bereichen im Recycling-System auch in davon abgegrenzten Strukturen lokalisiert ist. Als bekannte Beispiele seien hier die Kompartimente des klassischen sekretorischen

Pfads (ER, Golgi-Apparat) sowie die PM genannt, jedoch ist auch die parallele Nutzung alternativer Transportwege denkbar.

Betrachtet man andere Viren, für deren Oberflächenproteine eine Assoziation mit dem Recycling-System gezeigt werden konnte, so fällt auf, dass einige dieses Kompartiment nicht primär passieren, sondern zunächst am RE vorbei zur Oberfläche gelangen, um anschließend von dort via Re-Endozytose in das Recycling-System einzutreten (Diederich et al., 2012; Hollinshead et al., 2012; Kirschman et al., 2018). Im Falle des MARV-GP spricht zwar auf der einen Seite bereits die nur geringe Kollokalisierung mit frühen Endosomen (Abb. 5.1, GP + EEA1 bzw. GFP-Rab5) gegen eine Re-Endozytose. Auf der anderen Seite konnte dennoch gelegentlich eine Überlappung mit EEA1 und GFP-Rab5 beobachtet werden. Weiterhin zeigte mit dem Fusionsprotein des Nipahvirus (NiV-F) ein in hohem Maße zur Re-Endozytose neigendes Glykoprotein (Vogt et al., 2005; Diederich et al., 2012) eine deutliche Kollokalisierung mit MARV-GP (Abb. 5.2 A). Aus diesem Grunde sollte mithilfe eines Antikörper-Aufnahme Assays (beschrieben in Vogt et al., 2005) ausgeschlossen werden, dass MARV-GP von der Oberfläche re-endozytiert wird. Als Positivkontrolle diene hierbei das oben erwähnte NiV-F.

Dazu wurden subkonfluente HuH7-Zellen zunächst mit für MARV-GP bzw. NiV-F kodierenden Plasmiden transfiziert. Nach 24 h wurden anschließend an der Zelloberfläche lokalisiertes GP bzw. F nativ, d.h. ohne vorherige Fixierung, mit spezifischen Primär-Antikörpern markiert. Um zu gewährleisten, dass die Antikörper nicht in die Zelle gelangen, wurden dabei jegliche Endozytose durch eine Inkubation bei 4 °C geblockt. Im Anschluss wurden die Zellen für 30 Minuten entweder bei 4 °C belassen (Negativkontrolle) oder die Temperatur auf 37 °C erhöht, um eine Endozytose der markierten Oberflächenproteine zu ermöglichen. Darauffolgend wurden die Zellen fixiert und zunächst die verbliebenen Oberflächenproteine mit einem Alexa Fluor 594-gekoppelten Sekundär-Antikörper gefärbt, bevor die Zellmembran permeabilisiert und internalisiertes GP bzw. F mit einem zweiten, Alexa Fluor 488-konjugierten Sekundär-Antikörper markiert wurde.

Wie erwartet, konnten im Falle der 4 °C-Kontrollen weder für MARV-GP noch für NiV-F internalisierte Proteine detektiert werden, während an der Oberfläche beide Proteine präsent waren (Abb. 5.2 B, linke Spalte). Wenn jedoch durch den Temperaturwechsel zu 37 °C eine Endozytose ermöglicht wurde, konnten in NiV-F-exprimierenden Zellen deutliche intrazelluläre Signale beobachtet werden, während in MARV-GP-exprimierenden Zellen kein internalisiertes GP detektierbar war (Abb. 5.2 B, rechte Spalte). Daraus lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass MARV-GP nicht von der Zelloberfläche re-endozytiert wird und das Recycling-System daher voraussichtlich direkt im Zuge seines biosynthetischen Transportwegs zwischen dem Golgi-Apparat und der Zelloberfläche erreicht.



**Abb. 5.2: MARV-GP kolokalisiert mit NiV-F, wird jedoch nicht von der PM re-endozytiert.**

(A) IFA zur Lokalisation von MARV-GP und NiV-F. Subkonfluente HuH7-Zellen wurden mit pCAGGS-MARV-GP sowie pCAGGS-NiV-F-HA transfiziert und 24 hpt mit 4 % PFA fixiert und permeabilisiert. Die Färbung von MARV-GP erfolgte wie in Abb. 5.1 B, während NiV-F mit einem  $\alpha$ -HA IgG aus dem Kaninchen sowie einem gegen Kaninchen gerichteten Alexa Fluor 488-gekoppelten IgG-Serum und die Nuclei mithilfe von DAPI gefärbt wurden. Weiß umrahmte Bereiche sind auf der rechten Seite vergrößert dargestellt. Pfeile deuten auf kolokalisierende Strukturen von GP und NiV-F. (B) Antikörper-Aufnahme Assay. Subkonfluente HuH7-Zellen wurden wie in (A) transfiziert. Nach 24 h wurde GP bzw. NiV-F an der Oberfläche nativ bei 4 °C mit einem monoklonalen Maus- $\alpha$ -GP IgG (50-6-10) bzw. einem Meerschweinchen- $\alpha$ -NiV Serum markiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 min entweder bei 4 °C belassen (Kontrolle) oder bei 37 °C eine Endozytose der markierten Proteine von der Oberfläche zugelassen. Danach wurden die Zellen fixiert und zunächst die an der Oberfläche verbliebenen Proteine mit einem Alexa Fluor 594-gekoppelten Ziege- $\alpha$ -Maus bzw. Ziege- $\alpha$ -Meerschweinchen IgG-Serum gefärbt, bevor restliche freie Bindestellen mit HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern gegen Maus bzw. Meerschweinchen abgesättigt wurden. Im Anschluss wurden die Zellen permeabilisiert und internalisierte Proteine mit einem Ziege- $\alpha$ -Maus bzw. Ziege- $\alpha$ -Meerschweinchen IgG-Serum, jeweils gekoppelt an Alexa Fluor 488, sowie die Nuclei mit DAPI gefärbt. Dargestellt sind repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Experimenten. Maßstabsbalken = 10  $\mu$ m.

Zusammenfassend sprechen diese Ergebnisse dafür, dass sich die Transportwege von MARV-GP und NiV-F in einem gemeinsamen intrazellulären Kompartiment überschneiden. Während NiV-F jedoch stark von der PM re-endozytiert wird und daher voraussichtlich über endozytotisches Recycling dieses Kompartiment erreicht (Diederich et al., 2012), scheint MARV-GP diesen Weg nicht zu nutzen. Da endozytotische und biosynthetische Wege im zellulären Recycling-System zusammenlaufen und auch

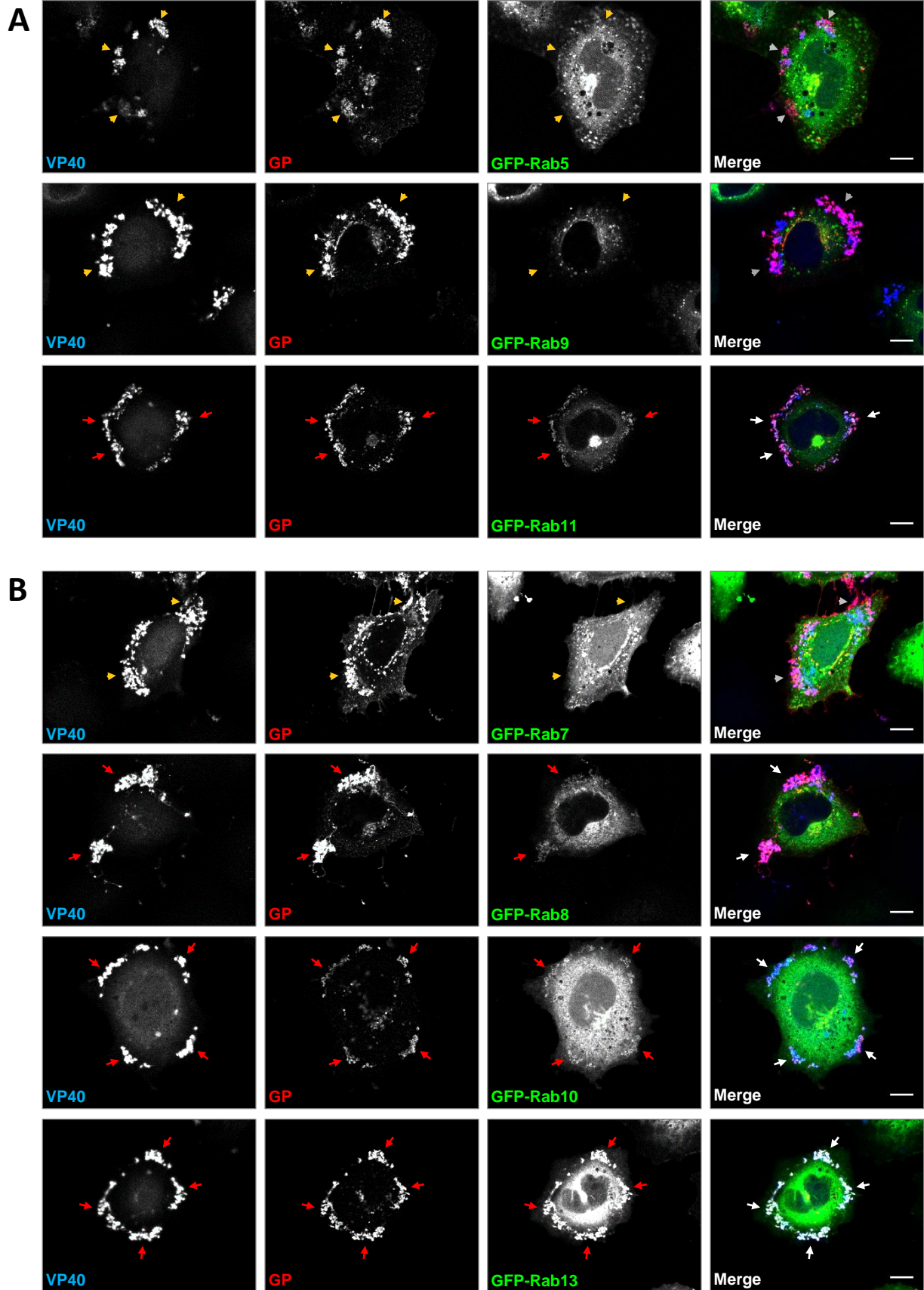


die Kollokalisationsstudien von GP und endosomalen Markerproteinen (Abb. 5.1) auf dieses Kompartiment hindeuten, legen die bisherigen Ergebnisse eine Assoziation von MARV-GP und dem Recycling-System nahe, die sich zwischen dem Golgi-Apparat und der PM zu ereignen scheint.

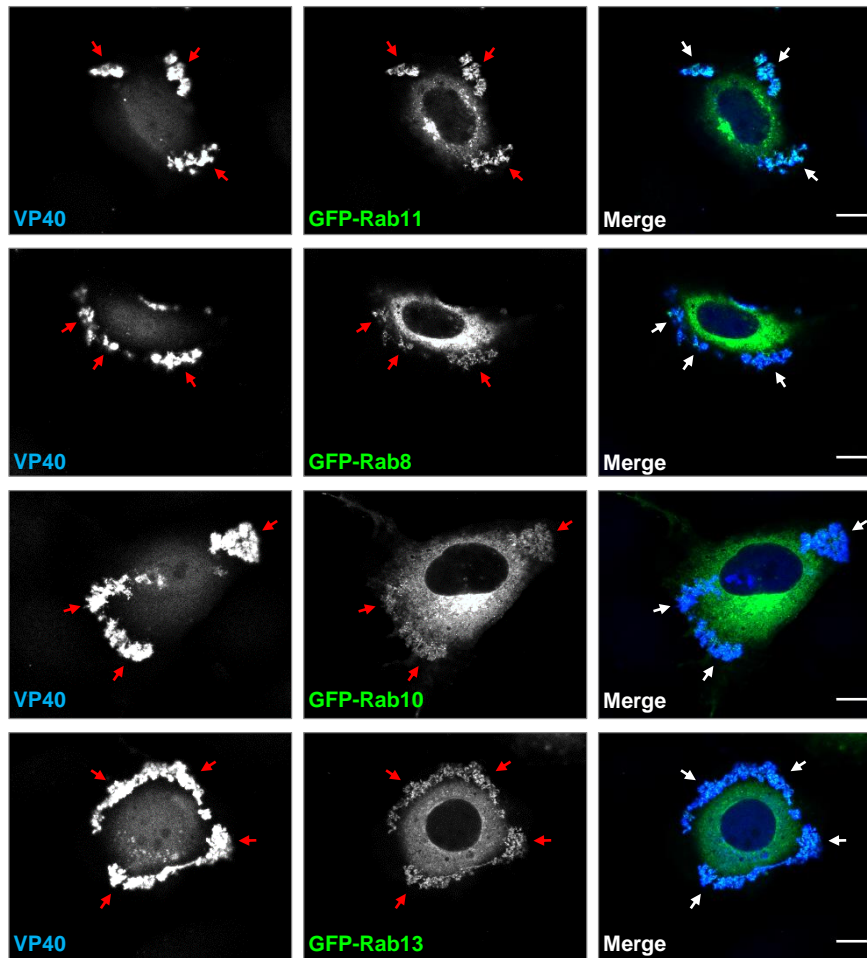
### 5.1.2 Untersuchung der Assoziation VP40-reicher Membrancluster mit dem Marburg Virus Glykoprotein und endosomalen Markerproteinen in transfizierten Zellen

Die rekombinante Expression des MARV-Matrixproteins VP40 ist gekennzeichnet von der Bildung peripherer, großflächiger, VP40-positiver Cluster an der PM. Diese im Elektronenmikroskop als Membranwölbungen („*curved sheets of membranes*“, Kolesnikova et al., 2002) erscheinenden Strukturen weisen Charakteristika von „*Lipid Rafts*“ auf und VP40-reiche Regionen an der PM konnten weiterhin als „*Budding-sites*“ für filamentöse VLPs identifiziert werden (Bavari et al., 2002; Swenson et al., 2004; Kolesnikova et al., 2002; 2004a). Im Einklang mit der Funktion als virale „*Budding-sites*“ konnte eine Redistribution von GP in diese peripheren VP40-reichen Regionen beobachtet werden, die aus diesem Grund als Plattform für die Bildung der Hülle des MARV angesehen werden (Kolesnikova, 2004b; Mittler, 2007; Mittler, 2013). Frühere Studien weisen zudem darauf hin, dass der intrazelluläre Transport von VP40 mit endosomalen Membranen assoziiert ist (Kolesnikova et al., 2002; Kolesnikova et al., 2004a). Zudem konnte mithilfe der nativen Färbung von an der Zelloberfläche lokalisiertem GP gezeigt werden, dass die in der IFA detektierbaren VP40-Cluster nahezu ausschließlich an der PM lokalisiert sind (Halwe, 2014; Daten nicht gezeigt). Angesichts der prominenten Bedeutung der VP40-Cluster als Endpunkte des GP-Transports in der Zelle, sollte daher untersucht werden, ob auch im Falle der VP40-Cluster eine Verknüpfung mit RE vorliegt.

Zu diesem Zweck wurden GP und VP40 zunächst gemeinsam mit den GFP-gekoppelten endosomalen Markerproteinen Rab5, Rab9 bzw. Rab11 koexprimiert und die Zellen 24 h p.t. fixiert sowie permeabilisiert. Anschließend wurden GP und VP40 mit spezifischen Antikörpern gefärbt und die intrazelluläre Verteilung mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. In Konsistenz mit früheren Studien, erschien VP40 hauptsächlich in Form von peripheren Clustern an der PM, die zudem große Mengen an GP enthielten (Abb. 5.3 A, linke und linke mittlere Spalte). Darüber hinaus konnte eine Akkumulation von GFP-Rab11 als Marker von RE in den Clustern detektiert werden, während im Falle der früh- bzw. spätendosomalen Marker GFP-Rab5 und GFP-Rab9 kein solcher Effekt auftrat (Abb. 5.3 A, rechte mittlere Spalte). Um diesen Hinweis auf eine Verknüpfung der VP40-Cluster mit RE zu verifizieren, wurden anschließend weitere Rab-GTPasen getestet. Dabei zeigten all jene, für die eine Rolle im Recycling-System beschrieben ist (Rab8, Rab10, Rab13) denselben Phänotyp wie Rab11, wohingegen das spätendosomale Rab7 nicht in den Clustern detektiert werden konnte (Abb. 5.3 B).



C



**Abb. 5.3: Rab-GTPasen des Recycling Endosoms akkumulieren in peripheren MARV-VP40 Clustern.**

**(A)** Analyse der Assoziation von *Rab5*, *Rab9* bzw. *Rab11* mit MARV-GP und MARV-VP40. Subkonfluente HuH7-Zellen wurden mit pCAGGS-MARV-GP, pCAGGS-MARV-VP40 sowie pEGFP-Rab5, pEGFP-Rab9 bzw. pEGFP-Rab11 transfiziert und 24 hpt mit 4 % PFA fixiert und permeabilisiert. Die Färbung erfolgte mit einem monoklonalen Maus- $\alpha$ -MARV-GP IgG-Primärantikörper (31-11-9) in Kombination mit einem Alexa Fluor 594-gekoppelten Ziege- $\alpha$ -Kaninchen IgG-Serum sowie einem polyklonalen Kaninchen- $\alpha$ -MARV-NC IgG in Kombination mit einem Marina Blue-gekoppelten Ziege- $\alpha$ -Kaninchen IgG-Serum. Aufgrund der überlappenden Exzitations- und Emissionsspektren mit Marina Blue wurde auf eine DAPI-Färbung der Nuclei verzichtet. **(B)** Analyse der Assoziation von *Rab7*, *Rab8*, *Rab10* bzw. *Rab13* mit MARV-GP und MARV-VP40. Subkonfluente HuH7-Zellen wurden mit pCAGGS-MARV-GP, pCAGGS-MARV-VP40 sowie pEGFP-Rab7, pEGFP-Rab8, pEGFP-Rab10 bzw. pEGFP-Rab13 transfiziert und 24 hpt mit 4 % PFA fixiert und permeabilisiert. Die Färbung von GP und VP40 erfolgte wie in (A) beschrieben. **(C)** Analyse der Assoziation von *Rab8*, *Rab10*, *Rab11* bzw. *Rab13* mit MARV-VP40 in Abwesenheit von MARV-GP. Subkonfluente HuH7-Zellen wurden mit pCAGGS-MARV-VP40 sowie pEGFP-Rab8, pEGFP-Rab10, pEGFP-Rab11 bzw. pEGFP-Rab13 transfiziert und 24 hpt mit 4 % PFA fixiert und permeabilisiert. Die Färbung von VP40 wurde wie in (A) beschrieben durchgeführt. Pfeile deuten auf Akkumulationen von Rab-GTPasen in VP40-Clustern. Maßstabsbalken = 10  $\mu$ m.

Da infolge der Koexpression von GP und VP40 nicht eindeutig abgeleitet werden konnte, ob diese Umverteilung der RE-Marker in die Cluster eine Folge der Assoziation von GP mit diesen Endosomen darstellt oder ob VP40 selbst diesen Effekt auslöst, wurden die RE-Marker erneut unter Ausschluss von GP nur mit VP40 koexprimiert. Wie in Abb. 5.3 C zu sehen, behielten alle RE-Marker ihre Lokalisation in den VP40-Clustern, sodass die Schlussfolgerung gezogen werden kann, dass die Präsenz von VP40

ausreichend ist, um die Redistribution von Recycling-endosomalen Proteinen in periphere VP40-Cluster auszulösen. Tabelle 2 gibt einen Überblick über das Verhalten aller getesteten Markerproteine.

**Tabelle 5.2**

**Überblick über die VP40-induzierte Redistribution von endosomalen Markerproteinen**

Endosomaler Marker	Lokalisation	Lokalisation in peripheren VP40-Clustern
Rab5	frühes Endosom [1]	-
Rab7	spätes Endosom [2,3]	-
Rab9	spätes Endosom [4]	-
Rab8	Recycling Endosom [5]	+
Rab10	Recycling Endosom [6,7]	+
Rab11	Recycling Endosom [8]	+
Rab13	Recycling Endosom [9]	+

Referenzen:

1 - Bucci et al. (1992)	4 - Lombardi et al. (1993)	7 - Etoh und Fukuda (2019)
2 - Soldati et al. (1995)	5 - Ang et al. (2003)	8 - Ullrich et al. (1996)
3 - Méresse et al. (1995)	6 - Babbey et al. (2006)	9 - Nokes et al. (2008)

Zusammenfassend liefern diese Ergebnisse Hinweise darauf, dass durch die transiente Expression von MARV-VP40 spezifisch Markerproteine des RE in exakt den PM-Regionen gebunden werden, in denen die Bildung der Hülle des MARV sowie die Freisetzung von filamentösen VLPs stattfindet. Angesichts der beobachteten Assoziation von GP und RE (s. 5.1.1) ist daher denkbar, dass eine VP40-induzierte, spezifische Rekrutierung von RE zu den viralen „*Budding-sites*“ die Zusammenkunft von GP und VP40 im Vorfeld der Bildung der Virushülle orchestriert.

### **5.1.3 Untersuchung der Assoziation des Marburg Virus Glykoproteins und VP40 mit endosomalen Markerproteinen in Marburg Virus-infizierten Zellen**

Bei der Charakterisierung viraler Proteine eignen sich Studien in transient transfizierten Zellen oft sehr gut, um Eingangsthesen zu überprüfen und einen ersten Überblick über die Dynamiken zwischen Virus- und Wirtszellproteinen zu erhalten. Dennoch muss dabei bedacht werden, dass es sich hier um ein

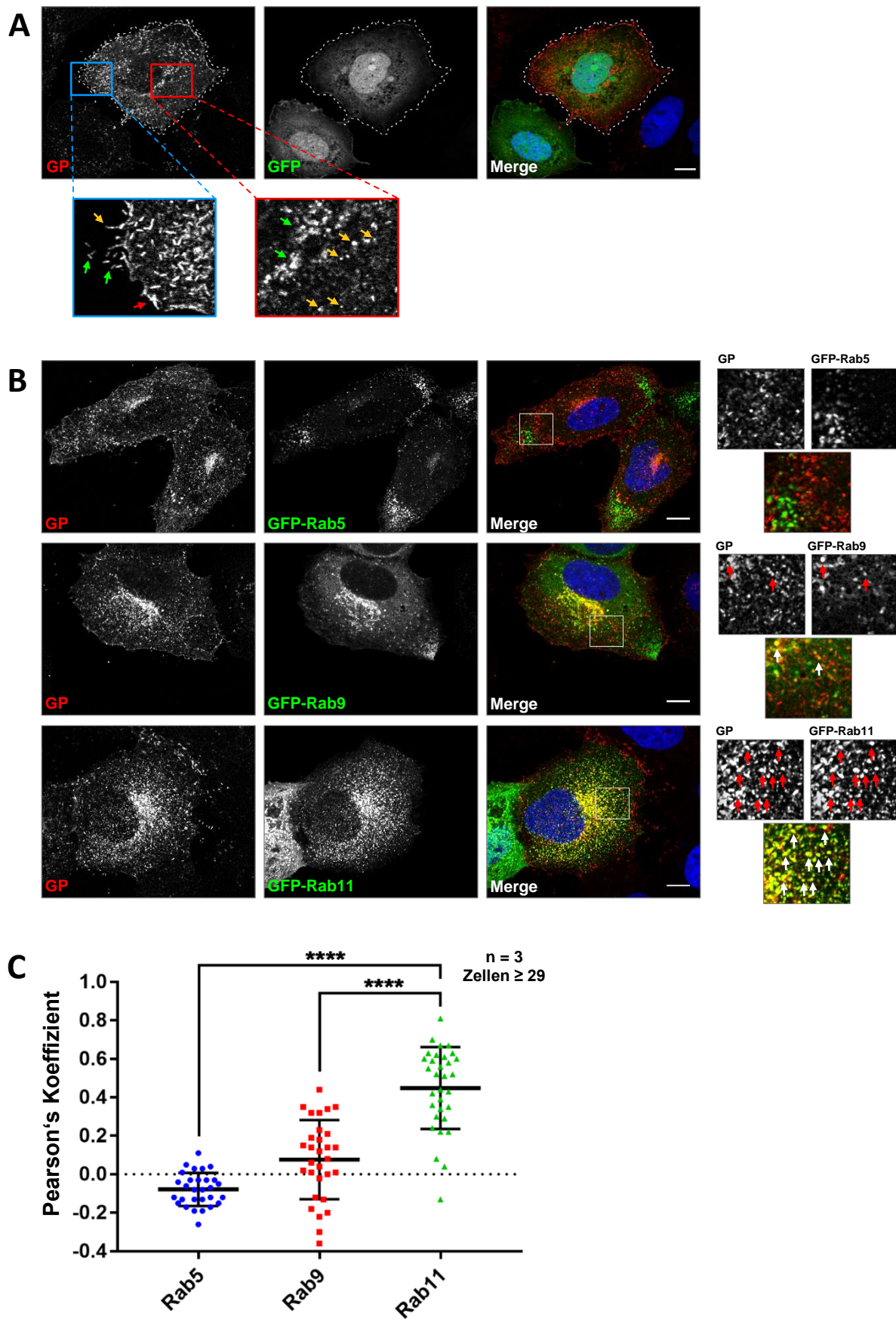
mehr oder weniger artifizielles System handelt, das einerseits aufgrund der Plasmid-basierten Expression der viralen Proteine (anstelle des Partikel-Eintritts und der Freisetzung der viralen Nukleinsäuren) sowie andererseits aufgrund des Fehlens bestimmter viraler Proteine nicht die „natürliche“ Situation einer Virusinfektion widerspiegelt. Aus diesem Grunde sollten im nächsten Schritt die Beobachtungen der Kolokalisationsanalysen aus 5.1.1 - 5.1.2 auf MARV-infizierte Zellen übertragen werden.

In Vorversuchen wurde festgestellt, dass eine MARV-Infektion von HuH7-Zellen bei simultaner Plasmid-basierter Expression der endosomalen Markerproteine am besten erreicht werden kann, wenn die Plasmide 4 h vor Zugabe des Inokulums transfiziert werden. Daher wurden subkonfluente Zellen zunächst mit Plasmiden kodierend für GFP-Rab5, GFP-Rab9 bzw. GFP-Rab11 transfiziert und 4 hpt mit MARV bei einer „*Multiplicity of Infection*“ (MOI) von 1 infiziert. 24 h *post infectionem* (hpi) wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und anschließend das MARV-GP mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung markiert.

Die Analyse der Verteilung des GP in GFP-exprimierenden Kontrollzellen ergab generell ein ähnliches Bild wie das in transfizierten Zellen, das jedoch einige kleinere Abwandlungen zeigte. Zum Vergleich ist daher in 5.4 A die Standard-Verteilung von MARV-GP in einer GFP-exprimierenden, MARV-infizierten Zelle dargestellt. Zum einen erschienen die perinukleären Akkumulationen von GP in MARV-infizierten Zellen weniger prononciert, was auf eine synchronisiertere Expression oder auch einen effizienteren Transport des GP während der ER-/Golgi-Passage hindeutet (Abb. 5.4 A, roter Kasten, grüne Pfeile). Darüber hinaus waren erneut kleine, meist sphärische Transportvesikel zu erkennen (Abb. 5.4 A, roter Kasten, goldene Pfeile). In der Peripherie zeigte sich wie in transfizierten Zellen eine gut erkennbare Färbung der PM (Abb. 5.4 A, blauer Kasten, roter Pfeil) und von zellulären Protrusionen (Abb. 5.4 A, blauer Kasten, goldener Pfeil). Zusätzlich konnten in der Nähe der PM infizierter Zellen oftmals filamentöse, an MARV-Partikel erinnernde Strukturen detektiert werden (Abb. 5.4 A, blauer Kasten, grüne Pfeile). Auch im Hinblick auf die Kolokalisation der endosomalen Markerproteine mit MARV-GP zeigten sich die Ergebnisse konsistent mit den Beobachtungen in transfizierten Zellen (Abb. 5.4 B). Die höchste Überlappung mit GP konnte im Falle des RE-Markers GFP-Rab11 verzeichnet werden, während GFP-Rab9 erneut gelegentlich eine partielle Kolokalisation in größeren, sphärischen Vesikeln zeigte, deren Anzahl in infizierten Zellen jedoch deutlich reduziert war. GFP-Rab5 kolokalisierte hingegen kaum mit GP, was dafür spricht, dass auch in infizierten Zellen keine Re-Endozytose von bereits an der Oberfläche lokalisiertem GP über frühe Endosomen stattfindet. Zur Bestätigung der visuellen Eindrücke wurde auch hier der PCC kalkuliert, der für GP und GFP-Rab5 bzw. GFP-Rab9 etwas unter bzw. über 0 lag (und damit geringer als in transfizierten Zellen) und im Falle von GP und GFP-Rab11 mit ca. 0.45 signifikant erhöht war (Abb. 5.4 C). Diese Ergebnisse bestätigen, dass MARV-GP nicht nur



in transfizierten, sondern auch in MARV-infizierten Zellen eine Assoziation mit dem endosomalen Recycling-System aufweist.

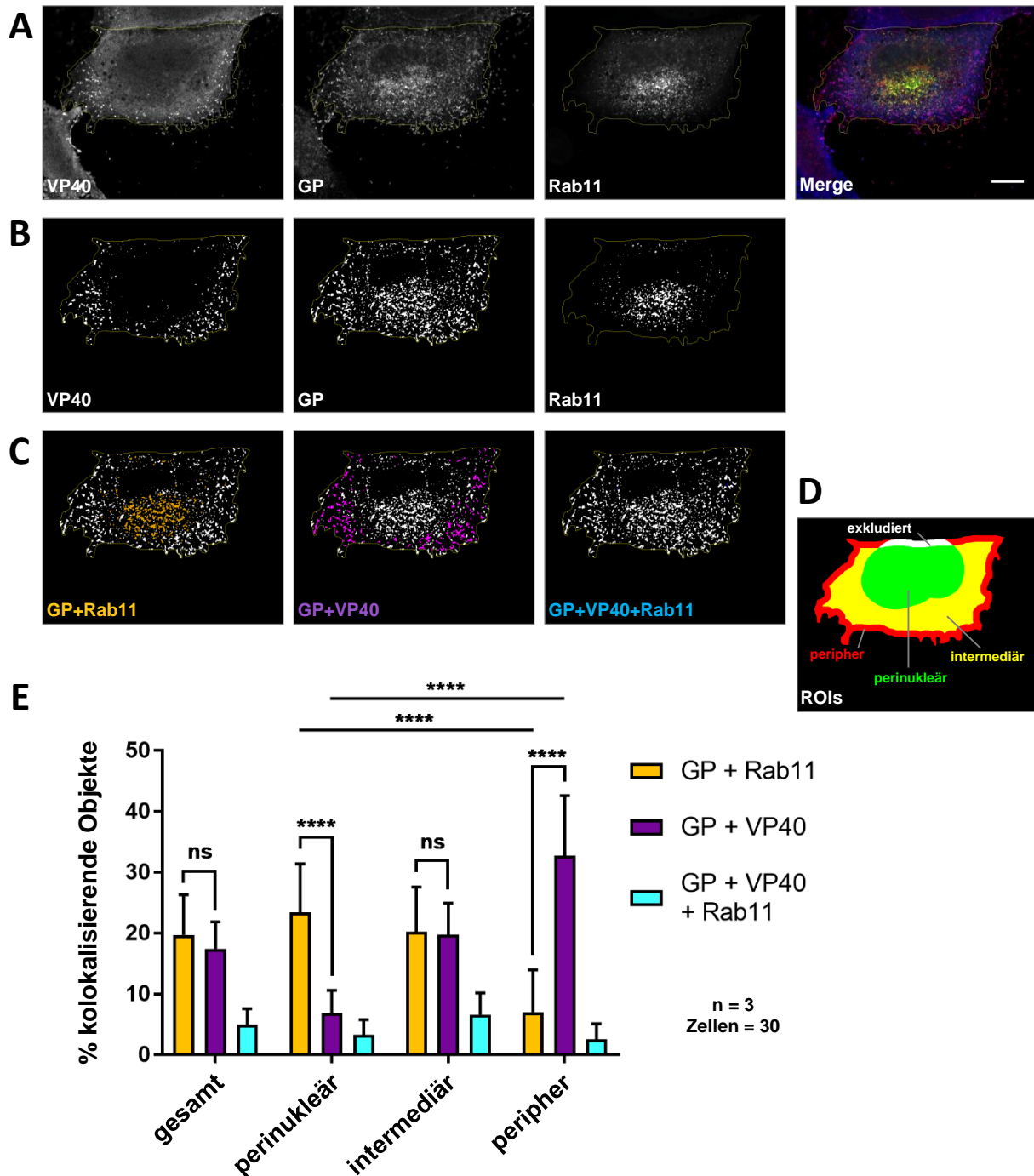


**Abb. 5.4: MARV-GP kolokalisiert mit dem Recycling Endosom-Marker Rab11 in MARV-infizierten Zellen.**

**(A) Verteilung von GP in MARV-infizierten Zellen.** Subkonfluente HuH7-Zellen wurden mit pEGFP transfiziert und 4 hpt mit MARV bei einer MOI von 1 infiziert. 24 hpi wurden die Zellen zweimal über Nacht mit 4 % PFA fixiert und anschließend permeabilisiert. Die Färbung von MARV-GP und der Nuclei erfolgte wie in Abb. 5.1 B beschrieben. Der blau umrahmte, vergrößerte Bereich zeigt peripher lokalisiertes GP an der PM (rote Pfeile) und zellulären Protrusionen (goldene Pfeile) sowie filamentöse, voraussichtlich bereits freigesetzte Partikel (grüne Pfeile). Der rot umrahmte, vergrößerte Bereich zeigt intrazelluläres GP in perinukleären Strukturen (grüne Pfeile) sowie sphärischen Transportvesikeln (goldene Pfeile). **(B) IFA der Lokalisation von MARV-GP und endosomalen Rab-GTPasen in MARV-infizierten Zellen.** Subkonfluente HuH7-Zellen wurden mit pEGFP-Rab5, pEGFP-Rab9 bzw. pEGFP-Rab11 transfiziert und 4 hpt mit MARV bei einer MOI von 1 infiziert. 24 hpi wurden die Zellen zweimal über Nacht mit 4 % PFA fixiert und anschließend permeabilisiert. Die Färbung von MARV-GP und der Nuclei erfolgte wie in Abb. 5.1 B beschrieben. Weiß umrahmte Bereiche sind auf der rechten Seite vergrößert dargestellt. Pfeile deuten auf kolokalisierende Strukturen von GP und endosomalen Rab-GTPasen. **(C) Quantitative Analyse der Kolokalisation.** Zur Quantifizierung des Ausmaßes der Kolokalisation zwischen GP und den endosomalen Rab-GTPasen wurde der PCC für  $\geq 29$  Zellen aus jeweils drei unabhängigen Experimenten kalkuliert. Geometrische Symbole repräsentieren den PCC einer einzelnen analysierten Zelle, während die Balken jeweils den Mittelwert inklusive Standardabweichung angeben. Die statistische Analyse erfolgte mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests. \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ . Maßstabsbalken = 10  $\mu\text{m}$ .

Unterzieht man die Verteilungen von GP und GFP-Rab11 in MARV-infizierten Zellen einer genaueren Analyse, fällt auf, dass die Kolokalisation vor allem im Zellinneren stattzufinden scheint, während GP-positive Bereiche an den Zellrändern sowie in zellulären Protrusionen kein Rab11 beinhalten (Abb. 5.4 B, unteres Panel). Dies war überraschend, da GFP-Rab11 in transfizierten Zellen in den peripheren, VP40-reichen Clustern akkumulierte (Abb. 5.3). Auch in MARV-infizierten Zellen befinden sich große Mengen an VP40 an der PM und insbesondere in Filopodien, in denen der Zusammenbau und letztlich die Freisetzung naszierender MARV-Partikel stattfindet (Kolesnikova et al., 2002; 2007; Schudt et al., 2013). Um daher die Lokalisation von VP40 in die Analyse miteinzubeziehen wurden im nächsten Schritt GFP-Rab11-exprimierende Zellen wie in Abb. 5.4 beschrieben mit MARV infiziert, fixiert und anschließend sowohl GP als auch VP40 mit entsprechenden Antikörpern angefärbt. Wie in Abb. 5.5 A dargestellt, wies das VP40 eine andere Verteilung im Vergleich mit den transfizierten Zellen auf. Anstatt der prominenten Cluster-Strukturen, zeigte sich eine überwiegend diffuse Verteilung des VP40 und nur in der Nähe der Zellgrenzen und zellulären Protrusionen konnten distinkte VP40-positive und meist filamentös geformte Strukturen detektiert werden, die in der Regel GP, aber kein Rab11 enthielten. In mehr zum Zellzentrum hin gelegenen Bereichen konnte hingegen eine Kolokalisation von GP und Rab11, jedoch ohne VP40 festgestellt werden, was wiederum im Einklang mit den Beobachtungen in Abb. 5.4 steht.

Um diese unterschiedlichen Abhängigkeiten einer genaueren Analyse zu unterziehen und einen Einblick in die Dynamik des GP-Transports zu bekommen, wurde im nächsten Schritt quantitativ bestimmt, in welchen Bereichen der Zelle GP mit Rab11 bzw. mit VP40 kolokalisiert. Dazu wurden die Zellen in drei voneinander abgetrennte Sektionen unterteilt, a) eine perinukleäre (5  $\mu\text{m}$  um den Nukleus), b) eine intermediäre sowie c) eine periphere Region (1  $\mu\text{m}$  von der PM) (Abb. 5.5 D). Da sich der PCC aufgrund der sehr diffusen Verteilung des VP40 weniger zur Analyse der Kolokalisation eignete, wurde an dieser Stelle stattdessen eine Objekt-basierte Quantifizierung durchgeführt. Dabei



**Abb. 5.5:** MARV-GP kolokalisiert in zentralen Bereichen infizierter Zellen mit GFP-Rab11 und assoziiert in der Peripherie mit VP40.

**(A)** IFA der Lokalisation von MARV-GP, MARV-VP40 und GFP-Rab11 in MARV-infizierten Zellen. Subkonfluente HuH7-Zellen wurden mit pEGFP-Rab11 transfiziert und 4 hpt mit MARV bei einer MOI von 1 infiziert. 24 hpi wurden die Zellen zweimal über Nacht mit 4 % PFA fixiert und anschließend permeabilisiert. Die Färbung von MARV-GP erfolgte mit einem polyklonalen Kaninchen- $\alpha$ -MARV-GP IgG-Primärantikörper (0303-007, ibt) in Kombination mit einem Alexa Fluor 594-gekoppelten Ziege- $\alpha$ -Kaninchen IgG-Serum, während das VP40 mit einem monoklonalen IgG aus der Maus (40-2-2) in Kombination mit einem Alexa Fluor 647-konjugierten IgG-Serum aus der Ziege markiert wurde. Die Nuclei wurden mit DAPI gegengefärbt. Dargestellt ist ein repräsentatives Bild zur Erläuterung der Quantifizierungsmethode. Maßstabsbalken = 10  $\mu$ m. **(B)** Detektierte Objekte. Die Bilder zeigen die segmentierten Objekte in den drei Einzelkanälen, die für die objektbasierte Quantifizierung herangezogen wurden. **(C)** Kolokalisierende Objekte. Die weißen Objekte stellen jeweils GP-positive Strukturen dar. Kolokalisierende Objekte sind jeweils farblich hervorgehoben (links GP+Rab11; Mitte GP+VP40; rechts GP+Rab11+VP40). **(D)** Exemplarische schematische Darstellung der Unterteilung einer Zelle für die Quantifizierung in eine perinukleäre (grün), eine intermediäre (gelb) sowie eine periphere Region (rot). Überschneidende Bereiche (weiß)



wurden von der Analyse exkludiert. **(E) Quantitative Analyse der Kolokalisation.** Zur Quantifizierung wurde eine Objekt-basierte Kolokalisationsanalyse mithilfe des JACoP-Plugins für Fiji („*centre-particle coincidence*“) durchgeführt. Dazu wurden die in B) segmentierten GP-Objekte als Partikel definiert und jeweils geprüft, ob die Zentren der Rab11- bzw. VP40-Objekte innerhalb dieser Partikel lokalisiert sind. Insgesamt wurden 30 Zellen aus jeweils drei unabhängigen Experimenten analysiert. Die Balken repräsentieren jeweils den Mittelwert inklusive Standardabweichung. Die statistische Analyse erfolgte durch den Kruskal-Wallis-Test. *ns*; nicht signifikant, \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ .

wurden zunächst die klar definierbaren Strukturen in den einzelnen Kanälen mittels festgelegter Grenzwerte hinsichtlich Intensität und Größe segmentiert (repräsentativ in Abb. 5.5 B) und anschließend die Überlagerung dieser Objekte in den einzelnen Kanälen bestimmt (Details in 4.5.2). In Abb. 5.5 C sind in weiß alle identifizierten GP-Objekte dargestellt. Zusätzlich wurden jeweils die mit GFP-Rab11, VP40 bzw. GFP-Rab11 und VP40 kolokalisierenden Objekte farblich hervorgehoben. Deutlich erkennbar sind die GP/Rab11-positiven Strukturen eher im Zellzentrum und die GP/VP40-positiven Strukturen hingegen in der Zellperipherie lokalisiert, während eine Kolokalisation von allen drei Proteinen kaum detektiert werden konnte. Die Situation in dieser repräsentativen Zelle wird durch die Daten der quantitativen Analyse bestätigt (Abb. 5.5 E). Demnach wiesen insgesamt jeweils ca. 20 % der identifizierten GP-Objekte eine Kolokalisation mit GFP-Rab11 bzw. mit VP40 auf, wobei sich die Lokalisation dieser Überlagerungen allerdings deutlich unterschied. So zeigten in der perinukleären Region ca. 23 % der GP-Strukturen eine Assoziation mit GFP-Rab11, aber nur ca. 7 % waren positiv für VP40. Im Gegensatz dazu konnten in der peripheren Region bei 32 % der GP-Objekte eine Kolokalisation mit VP40, aber nur bei 7 % eine Überlappung mit GFP-Rab11 festgestellt werden. In der intermediären Region lagen diese Zahlen, wie auch bei der Betrachtung der Gesamtzelle, in einem vergleichbaren Rahmen bei ca. 20 %. Dreifach-positive Objekte konnten hingegen nur selten beobachtet werden.

Insgesamt deuten die Ergebnisse der Kolokalisationsanalyse in MARV-infizierten Zellen darauf hin, dass MARV-GP auch in der Infektion eine Assoziation mit Rab11-positiven RE aufweist. Interessanterweise scheint diese Assoziation in infizierten Zellen jedoch vor allem in zentral gelegenen Regionen aufzutreten, während GP in der Zellperipherie die Verknüpfung zu den Rab11-positiven RE verliert und stattdessen in Strukturen einwandert, die das Matrixprotein VP40 beinhalten. Diese Dynamik ist daher ein Hinweis darauf, dass insbesondere frühe Transportschritte, die das GP vom perinukleären Bereich zur PM führen, über RE verlaufen könnten. Spätere Schritte, in denen GP in der Peripherie bereits mit VP40 assoziiert ist, finden jedoch voraussichtlich abseits dieses endosomalen Kompartiments statt. Dass in transfizierten Zellen eine Akkumulation von verschiedenen Markern des RE in peripheren VP40-Clustern detektiert werden konnte, könnte mit dem artifiziellen Transfektionssystem zusammenhängen. In transient transfizierten Zellen neigt das VP40 zur Bildung der als charakteristisch beschriebenen, großflächigen Cluster an der PM, während diese in MARV-infizierten Zellen nur äußerst selten zu beobachten sind (Kolesnikova et al., 2017). Auch wenn noch unklar ist, was genau die

Formation dieser prominenten Cluster in transfizierten Zellen auslöst, könnten sie eine Folge einer ineffizienten Freisetzung sein, die letztlich dazu führt, dass das VP40 an der PM akkumuliert (Dolnik et al., 2008). Dabei könnten auch Wirtszellfaktoren, die in der infizierten Zelle nur einen sehr transienten Kontakt zu den VP40-reichen Membranregionen besitzen, in den Clustern eingeschlossen werden. Im Falle des einem GDP/GTP-abhängigen Zyklus unterworfenen Rab11 wäre beispielsweise denkbar, dass es einen Transport in Richtung VP40-reicher Membransubdomänen vermittelt, dort inaktiviert wird und im Anschluss wieder zu seinem Ausgangskompartiment zurückkehrt. Im Falle einer (artifizialen) VP40-Cluster-Bildung ist dieser Rückweg jedoch blockiert, was zu einem Einschluss von Rab11 in den Clustern führt. Tatsächlich konnte in meiner Masterarbeit bereits gezeigt werden, dass eine hauptsächlich GDP-gebundene Rab11-Mutante (Rab11 S25N) zwar die Cluster-Lokalisation behielt, eine primär GTP-gebundene Mutante (Rab11 Q70L) jedoch nicht in diesen Strukturen detektiert werden konnte (Halwe, 2014).

Fasst man die Ergebnisse aus 5.1 zusammen, konnte mithilfe einer komparativen Kolokalisationsanalyse eine Assoziation von MARV-GP mit Markerproteinen des RE in transfizierten sowie in MARV-infizierten Zellen gezeigt werden. Weiterhin wurde ausgeschlossen, dass bereits an der PM lokalisiertes GP über eine Re-Endozytose in das Recycling-System gelangt. Diese Ergebnisse legen eine Rolle des endosomalen Recycling-Systems für den Transport von MARV-GP vom Golgi-Apparat zur PM nahe. Der Fokus des zweiten Teils dieser Arbeit lag daher auf der Evaluation der funktionellen Bedeutung dieses Kompartiments für den GP-Transport.

## **5.2 Charakterisierung der funktionellen Bedeutung des endosomalen Recycling-Systems für den Transport des Marburg Virus-Glykoproteins**

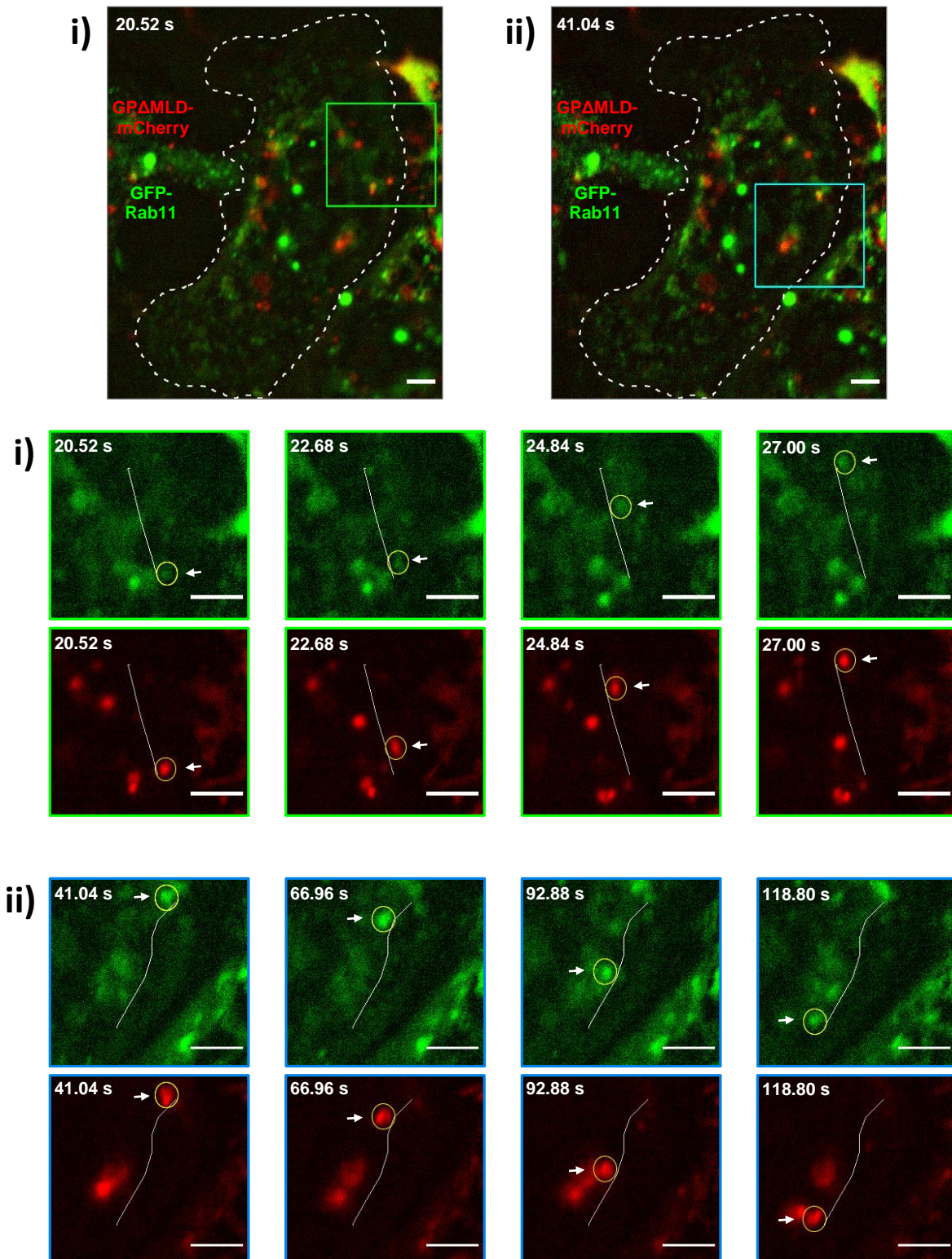
Die Experimente aus 5.1 sprechen dafür, dass das zelluläre Recycling-System mit dem Transport von MARV-GP zusammenhängt. Allerdings lag der Fokus dieser Experimente auf einer Analyse der Kolokalisation, also der mikroskopischen Überlagerung von Fluoreszenz-Signalen, die zwar wichtige Anhaltspunkte für die Überprüfung einer These liefern kann, deren Aussagekraft im Hinblick auf die exakten Zusammenhänge biologischer Prozesse innerhalb der beobachteten Strukturen jedoch limitiert ist. Um zu evaluieren, ob MARV-GP und das zelluläre Recycling-System nicht nur mikroskopisch kolokalisieren, sondern auch funktionell miteinander verknüpft sind, wurde daher zunächst mittels Lebendzellmikroskopie untersucht, ob ein Ko-Transport zwischen GP und Markern des RE beobachtet werden kann. Zur funktionellen Charakterisierung wurden außerdem zwei Schlüsselproteine des RE mittels siRNA (Rab11) bzw. der Verwendung DN Mutanten (Myosin Vb) depletiert und die Auswirkungen auf die Verteilung und die Oberflächenexpression von GP analysiert.

### 5.2.1 Analyse des Ko-Transports des Marburg Virus-Glykoproteins und Rab11 mittels Lebendzellmikroskopie

Das ubiquitär exprimierte und zur Familie der kleinen GTPasen zählende Rab11 ist eines der am besten beschriebenen Transportregulatoren im zellulären Recycling-System (Urbé et al., 1993; Ullrich et al., 1996; Welz et al., 2014). In seiner Funktion als „molekularer Schalter“, dessen Aktivitätsstatus in zyklischer Form in Abhängigkeit der Bindung von GDP bzw. GTP wechselt, nimmt Rab11 eine Schlüsselposition bei der Beförderung von unterschiedlichen Arten an Cargo in der Zelle ein (Stenmark, 2009; Welz et al., 2014). So steuert Rab11 ebenso das langsame Recycling von endozytierten Proteinen über RE wie auch den sekretorischen Transport vom TGN zur PM. Letzterer schließt ebenfalls in vielen Fällen einen Transit von RE ein, wodurch das Rab11 zu einem zentralen Akteur im zellulären Recycling-System wird, das als Schnittstelle zwischen sekretorischen und endozytotischen Pfaden fungiert (Urbé et al., 1993; Ullrich et al., 1996; Chen et al., 1998; Desclozeaux et al., 2008; Kelly et al., 2012; Welz et al., 2014).

Aufgrund dieser Schlüsselrolle von Rab11 im Transport von RE verbunden mit der beobachteten Kolokalisation von MARV-GP und GFP-Rab11 in transfizierten sowie MARV-infizierten Zellen (s. 5.1) sollte die funktionelle Bedeutung von Rab11 für den GP-Transport näher beleuchtet werden. Zusätzlich zu einer mikroskopischen Kolokalisation in fixierten Zellen, eignet sich die Lebendzellmikroskopie sehr gut, um nachzuweisen, dass die Fluoreszenzsignale nicht nur überlagern, sondern tatsächlich auch ein gemeinsamer „Ko-Transport“ stattfindet. Solche Lebendzellaufnahmen wurden in früheren Studien bereits erfolgreich angewandt, um neue Erkenntnisse über die Transportdynamiken filoviraler Proteine zu gewinnen (Schudt et al., 2013; Schudt et al., 2015; Takamatsu et al., 2018; Mittler, Schudt, Halwe et al., 2018). Daher sollte geprüft werden, ob sich ein Ko-Transport von MARV-GP und Rab11 mittels Lebendzellmikroskopie erfassen lässt.

Zu Visualisierung wurde in diesem Falle ein GP-Konstrukt gewählt, in dem die für einen Oberflächentransport sowie Inkorporation in neue Partikel entbehrliche MLD durch das Fluorochrom mCherry ersetzt wurde („GPΔMLD-mCh“; Mittler et al., 2011; Mittler, Schudt, Halwe et al., 2018). Dieses autofluoreszierende GPΔMLD-mCh wurde in einer Mischung von 1:1 mit dem wildtypischen GP kombiniert und gemeinsam mit GFP-Rab11 in HuH7-Zellen exprimiert. Nach 20 h erfolgte die Untersuchung am Lebendzellmikroskop (Nikon TE2000-E). Die Koexpression des mCh-markierten und des wildtypischen GP wurde gewählt, da nicht vollständig ausgeschlossen werden konnte, dass die fehlende MLD im GPΔMLD-mCh eine Assoziation mit Rab11 beeinflusst. Basierend auf Daten zum EBOV-VP40, die zeigen, dass eine Kombination aus wildtypischem und Fluorochrom-markiertem VP40 potentielle Funktionsverluste des rekombinanten Proteins ausgleichen kann (Takamatsu et al., 2018), wurde dies hier für MARV-GP übernommen.



**Abb. 5.6:** Kotransport von MARV-GPΔMLD-mCh und GFP-Rab11 in der Lebendzellmikroskopie.

*Lebendzellmikroskopische Aufnahme einer GPΔMLD-mCh- und Rab11-exprimierenden Zelle.* Subkonfluente HuH7-Zellen wurden mit pEGFP-Rab11 sowie einer 1:1-Mischung aus pCAGGS-MARV-GP und pCAGGS-MARV-GPΔMLD-mCherry transfiziert. Nach 21 h wurden Zeitraffer-Aufnahmen am Lebendzellmikroskop (Nikon TE2000-E mit DG4-Lichtquelle) erstellt. Insgesamt wurde eine Zeitspanne von 120 s aufgenommen (1 Bild / 1.08 s). Zu besserer Visualisierung wurden der Hintergrund in beiden Kanälen mithilfe des *Rolling Ball*-Algorithmus (Pixelgröße 50) in der Software Fiji reduziert. Die oberen Bilder zeigen eine exemplarische Zelle zu verschiedenen Zeitpunkten. Die grün bzw. blau umrahmten Bereiche sind unten jeweils vergrößert dargestellt und zeigen Ausschnitte eines GP/Rab11-Kotransports (Pfeile, gelbe Kreise) zu den angegebenen Zeitpunkten. Graue Striche skizzieren den Transportpfad. Maßstabsbalken = 5  $\mu\text{m}$ .



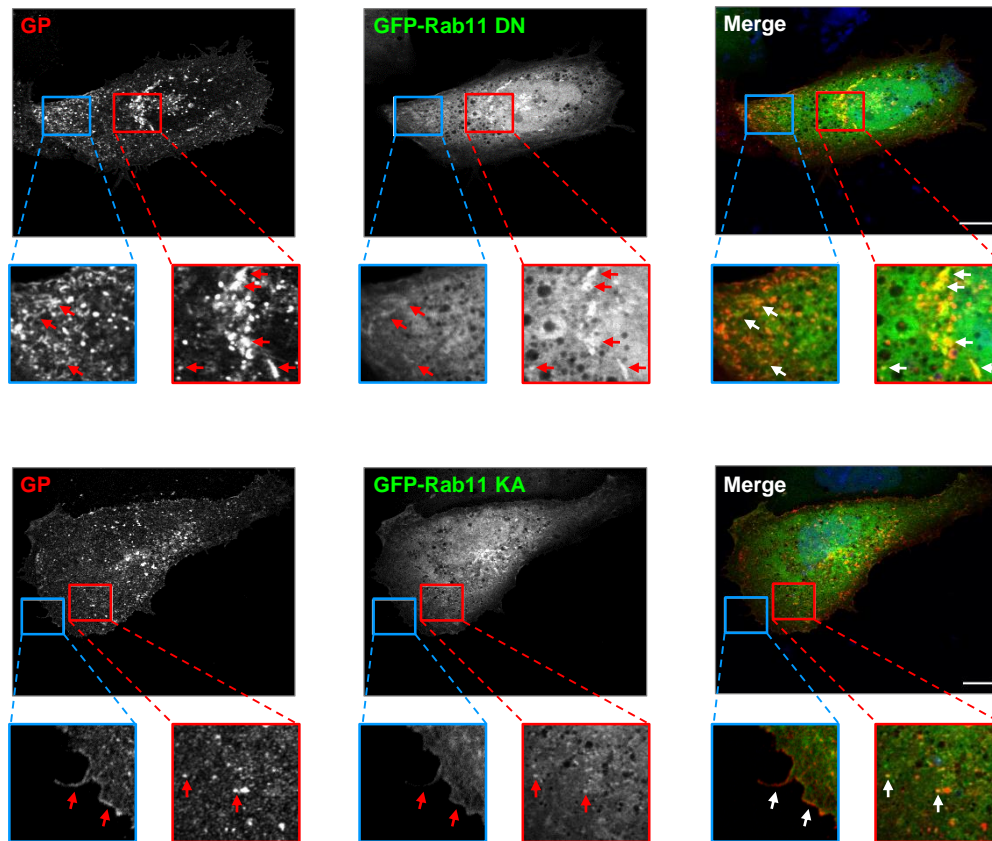
Abb. 5.6 zeigt anhand von zwei exemplarischen Bildausschnitten (grüner bzw. blauer Kasten, Bildabfolge des Ko-Transports in i) bzw. ii) vergrößert dargestellt) eine Zelle, in der ein Ko-Transport von GP $\Delta$ MLD-mCh und GFP-Rab11 beobachtet werden konnte. Dieser Ko-Transport fand dabei in Verbindung mit kleinen Vesikeln statt, die in Form und Größe den Strukturen glichen, in denen in 5.1 eine Kollokalisierung zwischen GP und GFP-Rab11 detektiert wurde (Abb. 5.6, Pfeile; Videos 1-3). Auch wenn diese Ergebnisse zeigen, dass ein Ko-Transport von GP $\Delta$ MLD-mCh und GFP-Rab11 möglich ist, muss konstatiert werden, dass dieses Ereignis nur selten zu beobachten war und sich der Großteil der Signale separiert voneinander bewegten. Zudem war die generelle Assoziation von GFP-Rab11 und GP $\Delta$ MLD-mCh nicht so ausgeprägt wie die zwischen GFP-Rab11 und wildtypischem GP in fixierten, mit Antikörpern gefärbten Zellen. Ein Grund dafür könnte sein, dass die subzelluläre Lokalisation des GP $\Delta$ MLD-mCh tatsächlich nicht deckungsgleich mit dem wildtypischen GP ist und dies auch durch die Koexpression des Wildtyps nicht ausreichend ausgeglichen werden konnte. Andererseits muss bedacht werden, dass bei der Lebendzellmikroskopie ein Weitfeldsystem benutzt wurde, das im Gegensatz zur konfokalen Mikroskopie eine verringerte Auflösung besitzt und insbesondere schwächere, feine Strukturen wie z.B. kleine Transportvesikel oft nicht darstellbar waren, wenn sie in der direkten Nachbarschaft größerer, stark fluoreszierender Strukturen lokalisiert waren. Weiterhin wurde in 5.1 ein GP-spezifischer Antikörper benutzt, der in der stark glykosylierten MLD bindet (C. Rohde, unveröffentlichte Daten) und damit für eine Färbung des reifen, vollständig glykosylierten *post*-Golgi GP sehr gut geeignet ist. Dadurch kann eine spezifischere Auflösung auch schwächerer GP-Signale in Kompartimenten zwischen dem Golgi und der PM erreicht werden. Bei Verwendung des GP $\Delta$ MLD-mCh war diese Fokussierung nicht möglich, da hier alle Formen, auch das unreife sowie auch eventuell fehlgefaltetes GP eine intrinsische Fluoreszenz zeigen. Dies könnte dazu geführt haben, dass eben diese kleinen Transportvesikel, die in 5.1 beobachtet wurden, nur unzureichend detektiert und aufgelöst wurden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass ein Ko-Transport zwischen MARV-GP und GFP-Rab11 möglich ist, auch wenn er hier nicht sehr häufig beobachtet werden konnte. Um eine klarere Aussage über die Funktion von Rab11 im GP-Transport zu treffen, sollten im nächsten Schritt daher die Auswirkungen einer Inhibition des endogenen Rab11 evaluiert werden.

### 5.2.2 Einfluss der Inhibition von Rab11 auf den Transport des Marburg Virus Glykoproteins

Um zu untersuchen, ob die spezifische Hemmung von Rab11 einen Einfluss auf den Transport von MARV-GP besitzt, wurden zwei unterschiedliche, experimentelle Ansätze verfolgt. Bei der ersten Methode wurden Rab11-Mutanten mit GP koexprimiert, die jeweils einen funktionellen Defekt in

ihrem GDP/GTP-Zyklus aufweisen und daher entweder primär GDP-gebunden (Rab11 S25N) bzw. GTP-gebunden (Rab11 Q70L) vorliegen. Die GDP-Mutante wird dabei als DN Form betrachtet, während für die GTP-Mutante eine konstitutive Aktivität (KA) angenommen wird (Ren et al., 1998; Fukuda, 2010). Beispiele für die Verwendung solcher Mutanten liefern Rab5, Rab8 oder das hier verwendete Rab11 (Stenmark et al., 1994; Peränen et al., 1996; Ullrich et al., 1996; Ren et al., 1998).



**Abb. 5.7: DN und KA Rab11-Mutanten zeigen eine Kolokalisation mit MARV-GP, besitzen aber nur geringen Einfluss auf die Verteilung von GP.**

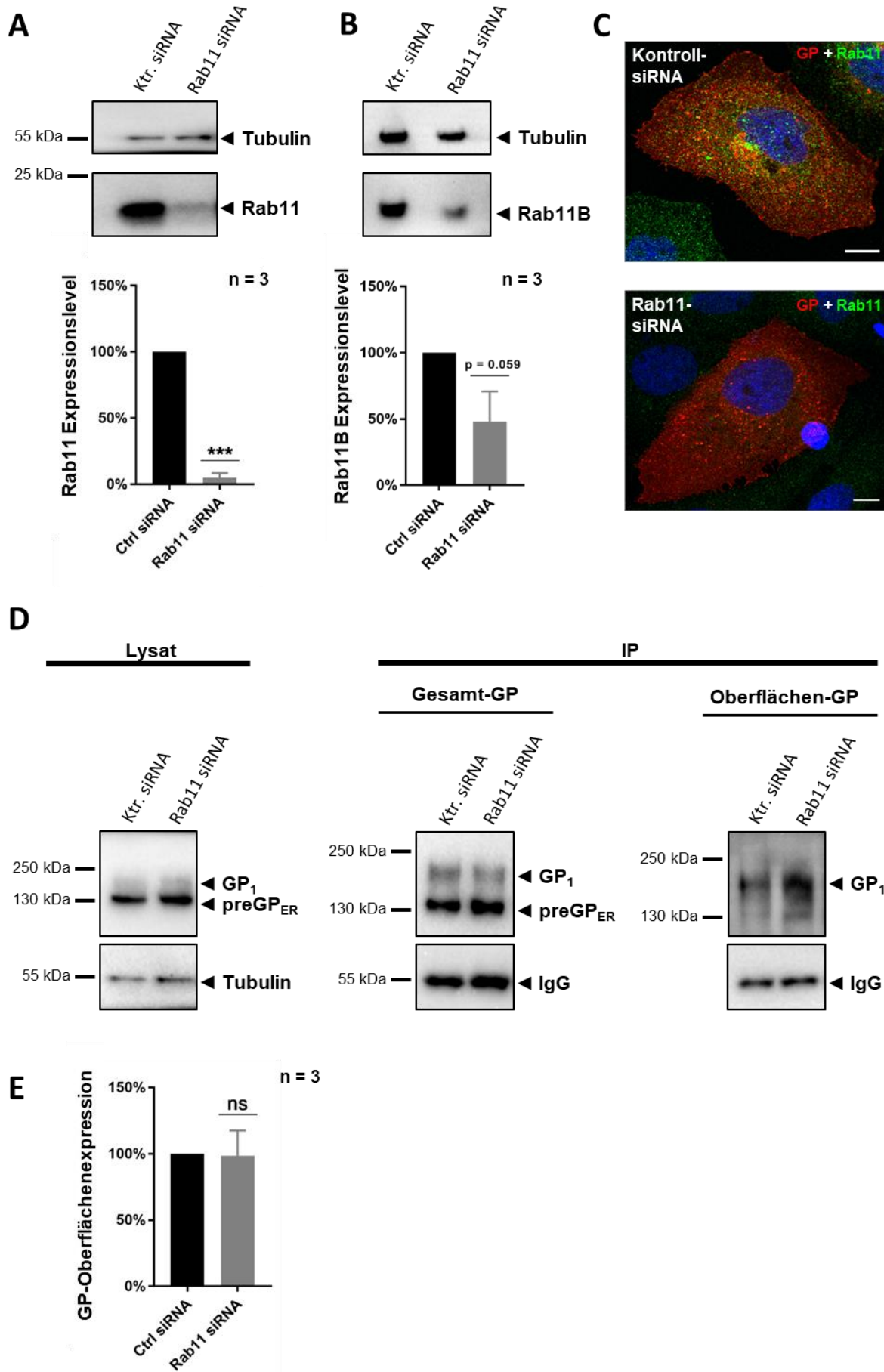
**(A)** IFA der Lokalisation von MARV-GP und DN bzw. KA Rab11-Mutanten. Subkonfluente HuH7-Zellen wurden mit pCAGGS-MARV-GP sowie pEGFP-Rab11 DN (S25N) bzw. pEGFP-Rab11 KA (Q70L) transfiziert und 24 hpt mit 4 % PFA fixiert und permeabilisiert. Die Färbung von MARV-GP und der Nuclei erfolgte wie in Abb. 5.1 B beschrieben. Blau bzw. rot umrahmte Bereiche sind im unteren Bereich vergrößert dargestellt, Pfeile deuten auf kolokalisierende Strukturen von GP und den Rab11-Mutanten. Maßstabsbalken = 10  $\mu$ m.

Zur Analyse des Einflusses dieser Mutanten auf die GP-Verteilung wurde MARV-GP gemeinsam mit GFP-gekoppelten DN bzw. KA Mutanten von Rab11 in HuH7-Zellen koexprimiert. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und gegen GP gefärbt. In Abb. 5.7 (oberes Panel) ist zu sehen, dass das DN Rab11 vor allem eine diffuse Verteilung aufwies und distinkte Strukturen vor allem im perinukleären Bereich, zu erkennen waren, in denen das DN Rab11 auch mit MARV-GP kolokalisierte (Abb. 5.7, oberes Panel, Pfeile in den roten und blauen Kästen). Auch wenn das GP eine leicht vermehrte Lokalisation in diesen DN Rab11-positiven, perinukleären Regionen aufzuweisen schien, konnte kein erheblicher Effekt auf die Distribution von GP beobachtet werden. Insbesondere zeigte

das GP weiterhin eine klare Lokalisation an der PM. Das KA Rab11 konnte vermehrt in punktförmigen, vesikulären Strukturen, die mehr in der Zellperipherie lokalisiert waren, sowie auch an der PM detektiert werden (Abb. 5.7, unteres Panel). Auch in diesen Strukturen konnte eine partielle Kolokalisation mit GP detektiert werden (Abb. 5.7, unteres Panel, Pfeile in den roten und blauen Kästen), was die Beobachtungen aus 5.1 stützt. Allerdings konnte auch bei Koexpression des KA Rab11 weder eine deutlich aberrante Verteilung noch eine verminderte PM-Lokalisation des GP beobachtet werden.

Aufgrund dieser unklaren Ergebnisse sollte die Rolle von Rab11 auf den GP-Transport zusätzlich mithilfe einer siRNA-vermittelten Depletion evaluiert werden. Analysiert wurde dabei sowohl die allgemeine Distribution von GP mittels IFA als auch speziell der Transport zur PM mithilfe eines Oberflächen-Biotinylierungs-Assays (OBA).

Für beide Analysemethoden wurden subkonfluente HuH7-Zellen zunächst mit Rab11-spezifischen bzw. nicht-zielgerichteten „Kontroll-“ siRNAs transfiziert, da Vorversuche die effizienteste Depletion von Rab11 nach 48 h gezeigt hatten. Daher wurden die Zellen 24 h nach der siRNA-Transfektion einer zweiten Transfektion mit für MARV-GP kodierenden Plasmiden unterzogen, bevor die Zellen weitere 24 h später (= 48 h nach siRNA-Behandlung) entweder fixiert und für die IFA gefärbt oder ein OBA durchgeführt wurde. Beim OBA wurden zunächst die Oberflächenproteine mit Membran-impermeablem Sulfo-NHS-Biotin markiert, gefolgt von der Zelllyse und der Immunpräzipitation (IP) des GP mittels Protein A-Sepharose und einem spezifischen anti-GP-Antikörper. Im Anschluss wurden sowohl eine Lysat- (vor der IP abgenommenes Ausgangsmaterial) als auch die IP-Probe mithilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mittels Western-Blot analysiert. Um eine verlässliche Aussage über die Oberflächenlevel des GP zu treffen, wurde in der IP-Probe einerseits das Gesamt-GP durch einen monoklonalen Primär-Antikörper sowie an eine Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelten Sekundär-Antikörper und andererseits das Biotin-markierte Oberflächen-GP mittels HRP-gekoppeltem Streptavidin gefärbt. Zusätzlich wurde das für die Präzipitation verwendete IgG als Ladekontrolle angefärbt. Die Detektion erfolgte nach Substratzugabe mittels Chemilumineszenz und dem ChemiDoc-System (BioRad®). Darüber hinaus wurde zur Kontrolle der Rab11-Depletion ein Teil des Lysats mit Rab11-spezifischen Antikörpern gefärbt. Für die Quantifizierung wurden jeweils die Intensitäten der Zielbanden mit der Software *ImageLab* (BioRad®) gemessen und mit denen einer Ladekontrolle (Tubulin bzw. IgG) in Relation gesetzt. Zur Berechnung der relativen Oberflächenexpression von GP wurden im Anschluss die so normalisierten Werte der Streptavidin-Färbung durch die normalisierten Werte des Gesamt-GP in der IP-Probe dividiert.





**Abb. 5.8: Die Depletion von Rab11 hat keinen Einfluss auf die Verteilung und den Oberflächentransport von MARV-GP.**

**(A) Kontrolle der Rab11-Expression in siRNA-behandelten Zellen.** Subkonfluente HuH7-Zellen wurden zunächst mit Rab11-spezifischen bzw. unspezifischen Kontroll-siRNAs in einer Endkonzentration von je 33 nM transfiziert. Nach 24 h wurde das Kulturmedium gewechselt und die Zellen zusätzlich mit pCAGGS-MARV-GP transfiziert. Weitere 24 h später wurden die Proteine an der Zelloberfläche für 30 min bei 4 °C mit Sulfo-NHS-Biotin markiert und anschließend die Zellen geerntet und lysiert, wobei ein Teil der Zellysate für die Rab11-Färbung abgenommen wurde. Die Proben wurden in der Folge mithilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt und einer Western Blot-Analyse unterzogen. Die Färbung erfolgte mit monoklonalen Maus- $\alpha$ -Rab11 bzw. Maus- $\alpha$ -Tubulin IgG sowie einem HRP-gekoppelten Ziege- $\alpha$ -Maus IgG-Serum. Für die Chemilumineszenz-basierte Detektion wurde das ChemiDoc System (BioRad) verwendet. Die Quantifizierung der Banden-Intensitäten wurde mit der zugehörigen Software ImageLab durchgeführt. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte der auf Tubulin normalisierten Rab11-Expression inklusive SD, wobei die Expressionslevel der Kontrolle auf 1 gesetzt wurden. **(B) Kontrolle der Rab11B-Expression in siRNA-behandelten Zellen.** Zur Kontrolle der Rab11B-Expression wurden HuH7-Zellen wie in (A) beschrieben transfiziert und 48 h nach siRNA-Transfektion (bzw. 24 h nach Plasmid-Transfektion) geerntet. Die erhaltenen Zellysate wurde anschließend ohne OBA direkt für die SDS-PAGE und Western Blot-Analyse verwendet. Die Tubulin-Färbung erfolgte wie in (A), Rab11B wurde mithilfe eines polyklonalen Kaninchen- $\alpha$ -Rab11B IgG sowie eines HRP-gekoppelten Ziege- $\alpha$ -Kaninchen IgG-Serums angefärbt. Die Detektion, Quantifizierung und Statistik wurden wiederum wie in (A) durchgeführt. **(C) Analyse der Verteilung von MARV-GP in Rab11-depletierten Zellen mittels IFA.** HuH7-Zellen wurden wie in (A) beschrieben transfiziert und 48 h nach siRNA-Transfektion (bzw. 24 h nach Plasmid-Transfektion) fixiert und permeabilisiert. Die Färbung von MARV-GP und der Nuclei erfolgte wie in Abb. 5.1 B beschrieben, während das endogene Rab11 mithilfe eines polyklonalen Kaninchen- $\alpha$ -Rab11 IgG sowie eines Alexa Fluor 488-gekoppelten Ziege- $\alpha$ -Kaninchen IgG-Serums markiert wurde. Maßstabsbalken = 10  $\mu$ m. **(D) Analyse der Oberflächenexpression von MARV-GP in Rab11-depletierten Zellen mittels Oberflächenbiotinylierungs-Assay.** HuH7-Zellen wurden wie in (A) beschrieben transfiziert, biotinyliert und lysiert. Anschließend wurde das im Lysat vorhandene GP mittels Protein A-Sepharose und eines monoklonalen Maus- $\alpha$ -MARV-GP IgG (50-6-10) präzipitiert (= IP). Sowohl die Lysat- als auch die IP-Probe wurden in der Folge einer SDS-PAGE und einer Western Blot-Analyse unterzogen und das vorhandene Gesamt-GP mittels eines monoklonalen Maus- $\alpha$ -MARV-GP IgG (50-6-10) in Kombination mit einem HRP-gekoppelten Ziege- $\alpha$ -Maus IgG-Serum gefärbt. Das Biotin-markierte Oberflächen-GP wurde mit HRP-konjugiertem Streptavidin markiert. Die Detektion wurde wie in (A) durchgeführt. Dargestellt sind repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Experimenten. **(E) Quantifizierung der Oberflächen-Expressionslevel von GP.** Zur Quantifizierung wurde jeweils die Bandenstärke des Gesamt-GP sowie des Oberflächen-GP bestimmt und auf die IgG-Level normalisiert. Anschließend wurden die relativen Oberflächenlevel durch Division des normalisierten Oberflächen-GP durch das normalisierte Gesamt-GP kalkuliert. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten inklusive SD, wobei die relativen Oberflächenlevel der Kontrolle auf 1 gesetzt wurden. Die statistische Auswertung in A) und E) erfolgte jeweils durch Student's t-Test mit Welch-Korrektur. ns: nicht signifikant. \*\*\*:  $p \leq 0,001$ .

Wie in Abb. 5.8 zu erkennen führte die Behandlung der mit gegen Rab11 gerichteten siRNA im Vergleich zur Kontrolle zu einer effizienten Depletion von ca. 95 % auf Proteinebene in der Western Blot-Analyse (Abb. 5.8 A), was zudem durch eine deutlich reduzierte Färbung von endogenem Rab11 in der IFA bestätigt wurde (Abb. 5.8 C, grüner Kanal). Um auszuschließen, dass bei Depletion von Rab11A das eng verwandte Rab11B, eine vor allem in Hirn, Herz und Testes vorkommende Isoform mit ca. 89 % Sequenzidentität sowie ähnlicher Lokalisation und Funktion (Lai et al., 1994; Schlierf et al., 2000; Kelly et al., 2012), eine Hochregulation erfährt und ggf. Funktionen des Rab11A substituiert, wurden außerdem die Rab11B-Level in siRNA-behandelten Zellen verglichen. Da die Lysat-Probe des OBA nicht genügend Material für eine Analyse des Rab11B lieferte, wurden hierfür separate Proben angefertigt, die identisch behandelt, aber nicht dem OBA unterzogen, sondern 48 h nach siRNA-Transfektion (= 24 h nach Plasmid-Transfektion) direkt geerntet wurden. Die Western Blot-Analyse zeigte hier, dass keine Hochregulation von Rab11B zu beobachten war, sondern im Gegenteil eine leichte Depletion von ca. 52 % erreicht wurde (Abb. 5.8 B). Betrachtet man die Auswirkungen der Rab11-Depletion auf den Transport von MARV-GP, zeigte sich in der IFA, dass sich die Distribution von GP im Vergleich mit den Kontroll-siRNA-behandelten Zellen nicht merklich unterschied. Stattdessen

zeigten beide Proben eine normale GP-Verteilung inklusive einer Lokalisation an den Zellgrenzen, indikativ für einen ungehinderten Oberflächentransport (Abb. 5.8 C, roter Kanal). Weiterhin war auffallend, dass die starke Kolo-kalisation von GP und GFP-Rab11 bei einer Färbung des endogenen Rab11 nicht in dem gleichen Ausmaß reproduziert werden konnte. Diese Diskrepanz könnte mit der nah am Detektionslimit liegenden, schwachen endogenen Färbung des Rab11 zusammenhängen.

Im nächsten Schritt wurde die GP-Oberflächenexpression im OBA untersucht. Abb. 5.8 D zeigt eine repräsentative Western-Blot-Analyse des OBA, in dem zunächst festgestellt werden kann, dass MARV-GP in der Lysat-Probe sowie in der Gesamt-GP-Färbung der IP-Probe erwartungsgemäß in Form von zwei Banden detektiert werden konnte. Die prominentere Bande auf Höhe von ca. 140 kDa repräsentiert dabei den unreifen GP-Vorläufer (preGP<sub>ER</sub>), während die schwächere obere Bande auf Höhe von ca. 170 kDa das reife, vollständig glykosylierte GP<sub>1</sub> darstellt. In der Streptavidin-Färbung sieht man im Gegensatz dazu fast ausschließlich eine Färbung auf Höhe des GP<sub>1</sub>, also der reifen Form, die an der Oberfläche erwartet wurde. Gelegentlich konnte auch in der Streptavidin-Färbung noch eine schwache Bande auf Höhe des preGP<sub>ER</sub> detektiert werden, was vermutlich dadurch erklärt werden kann, dass sich während des Biotinylierungsschritts bei 4 °C einige Zellen in Randbereichen des Zellrasens ablösten. Es ist anzunehmen, dass diese abgelösten Zellen dabei ihre strukturelle Integrität verloren haben und dadurch das Biotin Zugang zum intrazellulären GP erhielt. Dennoch ist klar erkennbar, dass die GP<sub>1</sub>-Form in der Streptavidin-Färbung die prominente Bande darstellte, während das GP<sub>1</sub> in der Gesamt-GP-Färbung erheblich schwächer als das preGP<sub>ER</sub> war. Daher kann die Färbung als valide angesehen werden. Für die Quantifizierung wurde ausschließlich die Intensität der GP<sub>1</sub>-Bande herangezogen. Vergleicht man nun die GP-Mengen der Rab11-depletierten und der Kontroll-Zellen, zeigt sich zunächst, dass beide Proben eine vergleichbare Expression von GP zeigen (Abb. 5.8 D, Lysat), die sich ebenso in einer vergleichbaren Menge an präzipitiertem Gesamt-GP äußert (Abb. 5.8 D, IP, Gesamt-GP). Betrachtet man die Streptavidin-Färbung ist keine Reduktion des Oberflächen-GP erkennbar (Abb. 5.8 D, IP, Oberflächen-GP). Dies wird auch durch die Quantifizierung von drei unabhängigen Experimenten bestätigt, die keine Veränderung der relativen Oberflächenexpression des GP in Rab11-depletierten im Vergleich zu Kontroll-siRNA-behandelten Zellen aufwies (Abb. 5.8 E).

Die Tatsache, dass weder durch die Überexpression der DN/KA Rab11-Mutanten noch durch eine siRNA-vermittelte Depletion von endogenem Rab11 ein Effekt auf die Verteilung oder auf die Oberflächenexpression von MARV-GP festgestellt werden konnte, weist darauf hin, dass Rab11 entgegen der Erwartung keine essentielle funktionelle Bedeutung für den Transport von GP besitzt. Dies ist insbesondere angesichts der deutlichen Kolo-kalisation von GP und GFP-Rab11 (s. 5.1) überraschend. Aufgrund der räumlichen und funktionellen Redundanz innerhalb der Familie der Rab-GTPasen ist jedoch denkbar, dass bei Depletion von Rab11 eine verwandte Rab-GTPase dessen

Funktionen im GP-Transport übernehmen kann. Möglich ist auch, dass GP und Rab11 nur eine (ggf. transiente) Ko-Präsenz aufweisen, die sich in der Kolo-kalisationsanalyse in 5.1 bedingt durch die Überexpression des GFP-Rab11 so deutlich manifestierte. Auch wenn die Ergebnisse der Rab11-Depletion gegen eine essentielle funktionelle Beteiligung der kleinen GTPase Rab11 im Transport von GP sprechen, deuten dennoch alle weiteren Experimente auf eine Rolle des Recycling-Systems als Ganzes für den Transport von MARV-GP hin. Aus diesem Grund sollte im nächsten Schritt ein weiterer Wirtszellfaktor untersucht werden, der eine essentielle Funktion innerhalb dieses zellulären Kompartiments besitzt.

### 5.2.3 Einfluss der Expression dominant-negativer Mutanten der Myosin V-Familie auf die intrazelluläre Verteilung des Marburg Virus-Glykoproteins

Rab-GTPasen besitzen Schlüsselfunktionen als Regulatoren zellulärer Transportprozesse. Ihre Wirkung entfalten diese Proteine jedoch nur in Verbindung mit weiteren zellulären Transportproteinen, sog. Effektoren. Eine Familie wichtiger Rab-Effektoren sind die Klasse V-Myosine, Aktin-basierte Motorproteine, die aufgrund ihrer Eigenschaft Cargo (z.B. Vesikel) zu binden zu den sog. unkonventionellen Myosinen gezählt werden. In Säugetieren werden die Klasse V-Myosine in die drei Isoformen Va, Vb und Vc eingeteilt (Hammer und Sellers, 2012). Myosin Va ist vor allem im Hirn sowie in Zellen der Haut zu finden und reguliert bspw. in Purkinjezellen die Extension des ER in dendritische Dornenfortsätze sowie in Melanozyten den Transport von Melanosomen zur PM über eine Interaktion mit Rab27A (Mercer et al., 1991; Wu et al., 2001; Hammer und Wagner, 2013). Myosin Vc hingegen ist vor allem in glandulären und Epithelzellen exprimiert und vermittelt den Transport von sekretorischen Granula. Auch eine Assoziation mit einem Rab8- und TfR-positiven Kompartiment ist beschrieben (Rodriguez und Cheney, 2002; Jacobs et al., 2009). Das dritte Paralog, Myosin Vb, weist eine ubiquitäre Expression auf und besitzt essentielle Funktionen im Transport von RE zur PM. In polarisierten Zellen agiert Myosin Vb dabei spezifisch am apikalen Recycling Endosom (ARE) (Lapierre et al., 2001; Wang et al., 2008). Die Fähigkeit von Myosin Vb, direkt sowohl mit Rab8A, Rab11A sowie dem Rab-Effektor Rab11FIP2 („*Rab11 family interacting protein 2*“) zu interagieren, weist diesem Motorprotein eine essentielle Funktion innerhalb verschiedener, zumindest partiell distinkter Transportwege im zellulären Recycling-System zu (Hales et al., 2002; Roland et al., 2007; Roland et al., 2009; Roland et al., 2011; Schäfer et al., 2014). Alle drei Myosine der Klasse V besitzen einen ähnlichen molekularen Aufbau. Dies umfasst einerseits die globuläre Schwanzdomäne („*Tail*“), dessen Funktion in der Bindung von Cargo über die Interaktion mit spezifischen Regulatoren wie z.B. Rab-GTPasen liegt, sowie die Motordomäne am Kopfende des Proteins, mit der die Bewegung entlang des Aktin-Zytoskeletts vermittelt wird (Hammer und Sellers, 2012). Diese klar definierte Struktur ermöglicht weiterhin die Generation von Deletionsmutanten, die nur noch über eine dieser beiden funktionellen Domänen

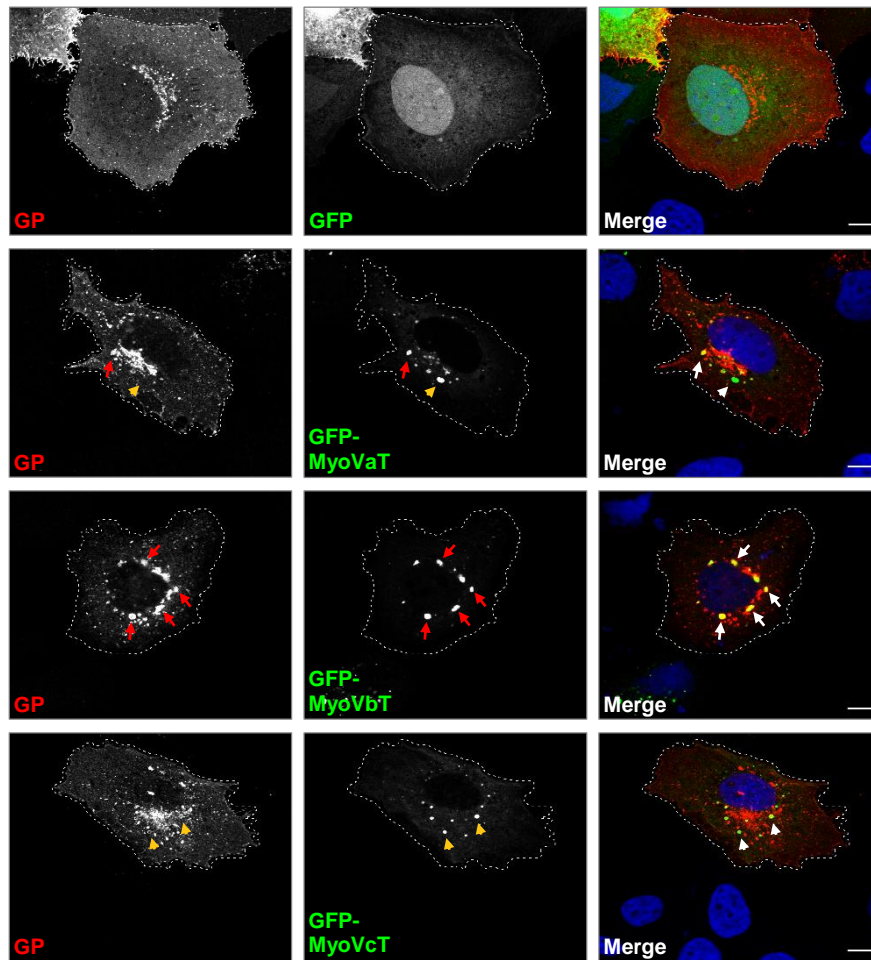
verfügen. Insbesondere die „Tail“-Mutanten der Klasse V-Myosine (MyoV Tail), bei denen die Hals- sowie die Motor-Kopfdomänen fehlen, haben sich dabei als äußerst wirkungsvolle DN Inhibitoren der jeweiligen Myosin V-vermittelten Transportwege erwiesen, da sie weiterhin ihren spezifischen Cargo binden, diesen jedoch nicht über das Zytoskelett transportieren können. In der Folge aggregieren die Myosine mit ihrem Cargo in intrazellulären, als kollabierte Membranzisternen beschriebenen Strukturen (Roland et al., 2011), wodurch Rückschlüsse über die blockierten Transportpfade sowie über die Myosin-Cargo-Wechselwirkungen gezogen werden können (Wu et al., 1998; Lapierre et al., 2001; 2005; Hammer und Sellers, 2012). Vor allem die „Tail“ Mutante des Myosin Vb wurde in einer Reihe von Studien erfolgreich eingesetzt, um den Transport entlang des zellulären Recycling-Systems zu blockieren, wodurch für eine Vielzahl an zellulären und viralen Proteinen eine Nutzung dieses Kompartiments nachgewiesen werden konnte (Lapierre et al., 2001; 2005; Wang et al., 2008; Roland et al., 2007; 2011; Brock et al., 2003; Stone et al., 2016). Basierend auf diesen Studien sollte daher evaluiert werden, ob der Transport von MARV-GP durch die Überexpression der DN Tail-Mutanten von Klasse V-Myosinen inhibiert werden kann. Vor dem Hintergrund einer vermuteten Rolle von RE stand dabei insbesondere das DN Myosin Vb Tail im Fokus der Untersuchungen, dessen Überexpression zu einer effizienten funktionellen Ablation des endosomalen Recycling-Systems führt (Lapierre et al., 2001; 2005).

Zunächst sollte mittels IFA untersucht werden, ob die Überexpression der MyoV Tail-Mutanten generell zu einer veränderten Verteilung von MARV-GP führt. Dazu wurden subkonfluente HuH7-Zellen mit Plasmiden transfiziert, die für MARV-GP sowie GFP bzw. den GFP-gekoppelten Tail-Mutanten von Myosin Va, Vb oder Vc (MyoVa/b/c Tail) kodierten. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und das GP mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung markiert, bevor die Proben am KLSM analysiert wurden. Abb. 5.9 A zeigt im obersten Panel zum Vergleich eine GP und GFP koexprimierende Zelle, die eine klassische GP-Verteilung aufweist. Wie bereits in vorherigen Teilen dieser Arbeit gezeigt, besteht diese vor allem aus drei Charakteristika: a) geringfügige bis moderate perinukleäre Akkumulationen, b) meist punktförmige Strukturen in Form von Transportvesikeln zwischen der perinukleären Region und der PM, c) eine deutlich erkennbare Färbung der Zellgrenzen inklusive zellulärer Protrusionen durch an der Oberfläche lokalisiertes GP.

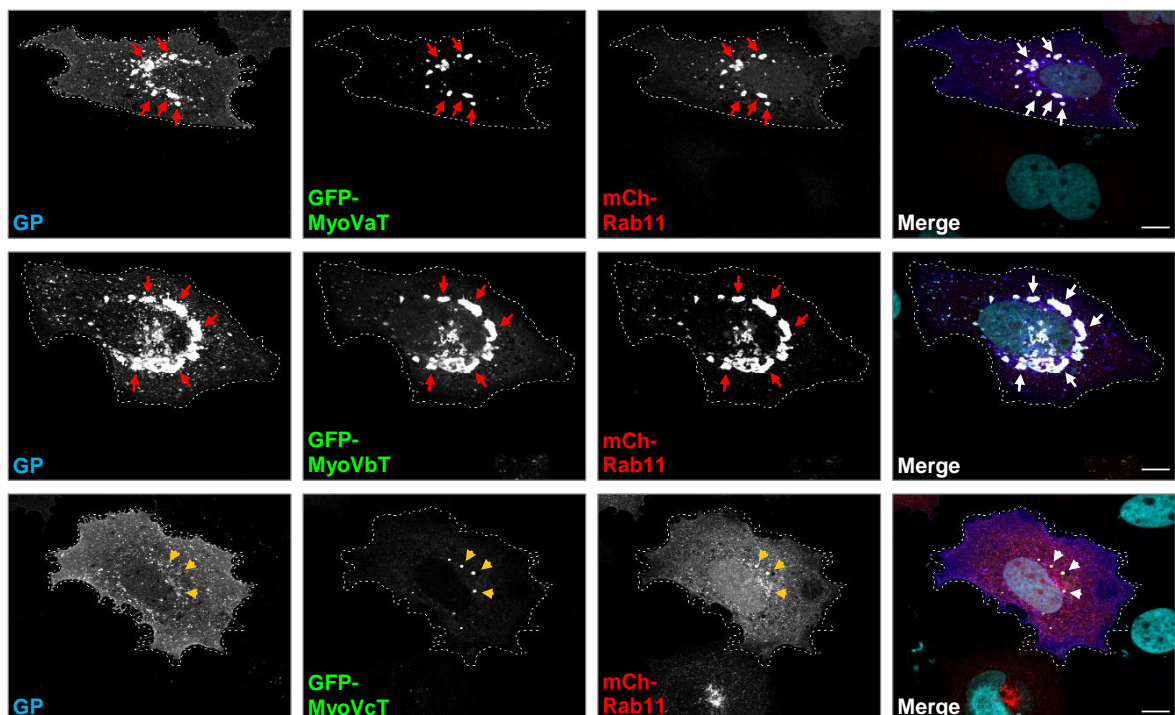
Die Expression der MyoV Tail-Mutanten führte in Übereinstimmung mit der oben referenzierten Literatur zu einer Bildung von intrazellulären Aggregationen, die vor allem im perinukleären Bereich lokalisiert waren (Abb. 5.9 A, Pfeile und Pfeilköpfe). Dabei fiel auf, dass insbesondere die Expression des MyoVb Tail zu einer aberranten Verteilung von MARV-GP führte, das partiell direkt in den MyoVb

Tail-Aggregaten und partiell in unmittelbarer Nachbarschaft akkumulierte (Abb. 5.9 A, drittes Panel, rote Pfeile).

**A**

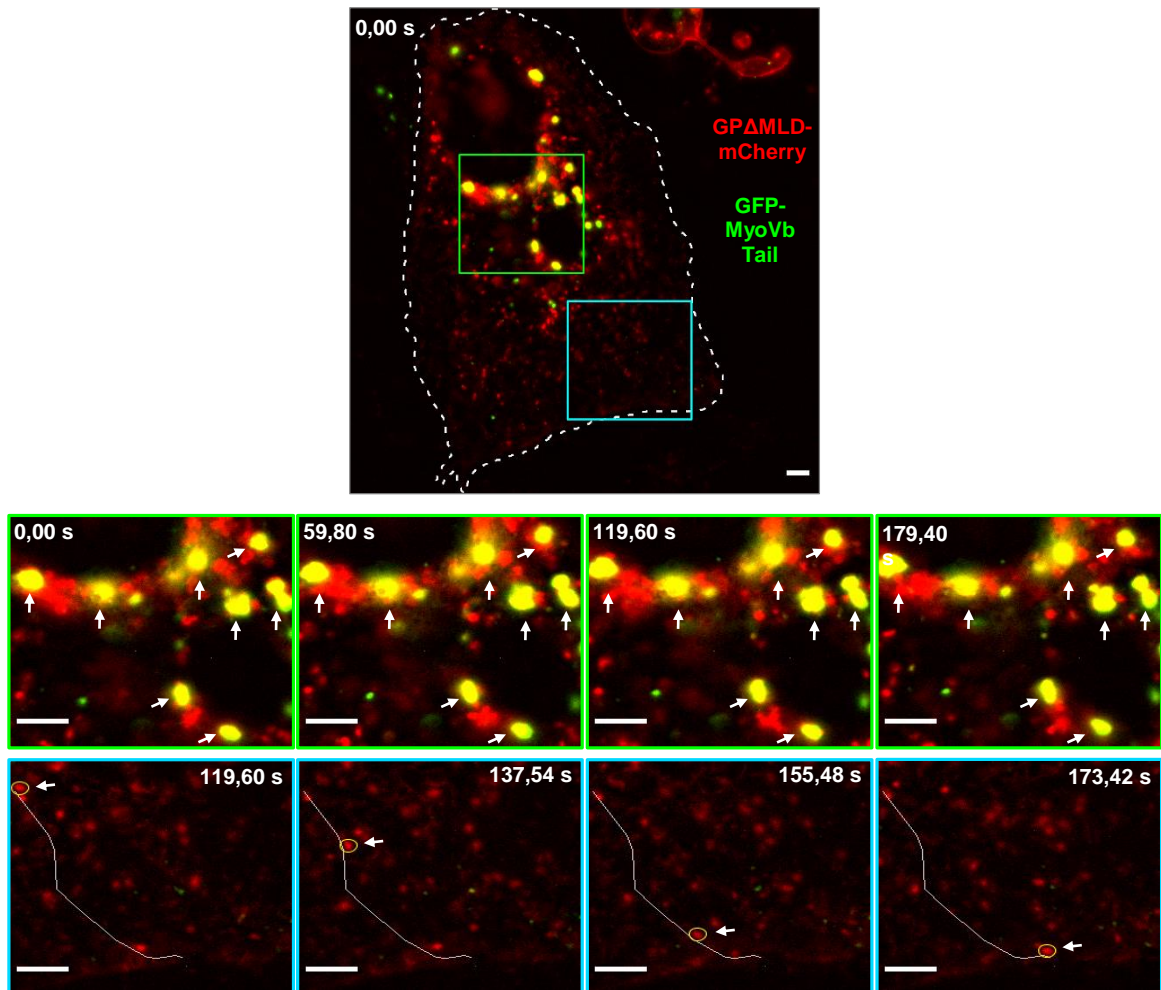


**B**





C



**Abb. 5.9:** Die Expression des DN MyoVb Tail führt zu einer aberranten intrazellulären Verteilung von MARV-GP.

**(A)** Analyse des Einflusses der DN MyoV Tail-Mutanten auf die Verteilung von MARV-GP. Subkonfluente HuH7-Zellen wurden mit pCAGGS-MARV-GP sowie pEGFP, pEGFP-MyoVa Tail, pEGFP-MyoVb Tail bzw. pEGFP-MyoVc Tail transfiziert und 24 hpt für 48 h mit 4 % PFA fixiert und permeabilisiert. Die Färbung von MARV-GP erfolgte mit einem monoklonalen Maus- $\alpha$ -MARV-GP IgG (31-11-9) in Kombination mit einem Alexa Fluor 594-gekoppelten Ziege- $\alpha$ -Maus IgG-Serum. Die Nuclei wurden mithilfe von DAPI anfärbt. **(B)** Analyse des Einflusses der DN MyoV Tail-Mutanten auf die Verteilung von MARV-GP in Koexpression mit *mCh-Rab11*. Subkonfluente HuH7-Zellen wurden mit pCAGGS-MARV-GP, pmCh-Rab11 sowie pEGFP-MyoVa Tail, pEGFP-MyoVb Tail bzw. pEGFP-MyoVc Tail transfiziert und 24 hpt für 48 h mit 4 % PFA fixiert und permeabilisiert. Die Färbung von MARV-GP erfolgte mit einem monoklonalen Maus- $\alpha$ -MARV-GP IgG (31-11-9) in Kombination mit einem Alexa Fluor 647-gekoppelten Ziege- $\alpha$ -Maus IgG-Serum. Die Nuclei wurden mithilfe von DAPI anfärbt. Die Aufnahme der Bilder in A) und B) erfolgte am KLSM (Leica SP5). Pfeile deuten auf Strukturen, die eine Akkumulation von GP und MyoV Tail zeigen, gestrichelte Linien skizzieren die Zellgrenzen. **(C)** Lebendzellmikroskopische Aufnahme einer GP- und MyoVb Tail-exprimierenden Zelle. Subkonfluente HuH7-Zellen wurden mit pEGFP-MyoVb Tail sowie einer 1:1-Mischung aus pCAGGS-MARV-GP und pCAGGS-MARV-GP $\Delta$ MLD-mCherry transfiziert. Nach 24 h wurden Zeitraffer-Aufnahmen der intrazellulären Transportdynamik am Lebendzellmikroskop (Nikon TE2000-E mit *Intensilight*-Lichtquelle) erstellt. Insgesamt wurde eine Zeitspanne von 180 s aufgenommen (1 Bild / 5.98 s). Zu besserer Visualisierung wurden der Hintergrund in beiden Kanälen mithilfe des *Rolling Ball*-Algorithmus (Pixelgröße 50) in der Software Fiji reduziert. Das obere Bild zeigt eine exemplarische Zelle zu Beginn der Aufnahme (0 s). Grün bzw. blau umrahmte Bereiche sind unten vergrößert dargestellt und zeigen die Bewegungsdynamik von MyoVb Tail-positiven (oben) bzw. MyoVb Tail-negativen (unten) GP-Strukturen zu den jeweils angegebenen Zeitpunkten. Pfeile in der oberen Bildfolge deuten auf immobiles GP in MyoVb Tail-Aggregaten, während der Pfeil in der unteren Bildfolge auf ein mobiles GP-Vesikel (gelber Kreis) zeigt, das sich in Richtung der PM bewegt. Der graue Strich skizziert den Transportpfad. Maßstabsbalken = 10  $\mu$ m (A,B) bzw. 5  $\mu$ m (C).

Außerdem war die GP-Färbung in der Peripherie und an den Zellgrenzen merklich reduziert, was auf einen inhibierten Oberflächentransport hindeutet. Im Gegensatz dazu schien die Überexpression von MyoVc Tail keinen Einfluss auf die GP-Verteilung zu nehmen (Abb. 5.9 A, viertes Panel, goldene

Pfeilköpfe). Weder konnte eine Akkumulation von GP in den MyoVc Tail-Aggregaten detektiert noch eine Abweichung von der charakteristischen Standardverteilung des GP festgestellt werden. Insbesondere blieb die deutliche PM-Färbung konserviert, sodass von einem korrekt verlaufenden Oberflächentransport ausgegangen werden kann. Gelegentlich konnte eine Umzirkelung der MyoVc-Aggregate mit GP beobachtet werden. Die Effekte des MyoVa Tail waren nicht so klar definiert wie im Falle des MyoVb bzw. MyoVc Tail. Zwar konnte auch hier ein Effekt auf die Verteilung des GP beobachtet werden, aber dieser war nicht so stark ausgeprägt wie im Falle des MyoVb Tail. So wiesen viele Zellen sowohl GP-positive als auch GP-negative MyoVa Tail-Aggregationen auf und auch die Gesamtverteilung zeigte sich nicht so stark aberrant wie bei Koexpression des MyoVb Tail, da z.B. die PM-Färbung oft noch deutlich erkennbar war (Abb. 5.8 A, zweites Panel, Pfeile und Pfeilköpfe).

Da die stärksten Effekte auf die GP-Verteilung durch die Expression von MyoVb Tail erreicht wurden, welches über die Interaktion mit Rab8 und Rab11 den Transport von RE vermittelt, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob mit Rab11 ein Marker von RE in den verschiedenen MyoV Tail-Aggregaten detektiert werden kann. Dazu wurde im obigen Versuchsaufbau zusätzlich ein mCherry-markiertes Rab11 (mCh-Rab11) exprimiert. Wie in Abb. 5.9 B zu erkennen, konnte im Falle von MyoVa und MyoVb Tail nicht nur eine Kolo-kalisation von mCh-Rab11 mit den Myosinen und GP in den perinukleären Aggregationen beobachtet werden, sondern die Überexpression von Rab11 schien diese Aggregate zusätzlich zu vergrößern und auch mehr GP im perinukleären Bereich zu binden (Abb. 5.9 B, obere zwei Panele). Darüber hinaus glichen sich die Effekte des MyoVa Tail auf die GP-Verteilung in Kombination mit mCh-Rab11 eher dem Phänotyp von MyoVb Tail an. Hingegen konnte nur eine geringe Überlagerung von mCh-Rab11 und MyoVc Tail festgestellt werden, wobei die Form und Größe der MyoVc Tail-Aggregationen keine merkliche Veränderung aufwiesen (Abb. 5.9 B, unteres Panel). Auch im Hinblick auf die Distribution von GP konnte analog zu der Koexpression ohne mCh-Rab11 keine Veränderung infolge der MyoVc Tail-Expression registriert werden.

Nachdem diese Ergebnisse für einen inhibierenden Effekt des DN MyoVb Tail auf den Transport von MARV-GP sprechen, sollte im nächsten Schritt evaluiert werden, ob dies auch mittels Lebendzellmikroskopie bestätigt werden kann. Dazu wurden das GFP-gekoppelte MyoVb Tail sowie parallel zu Abb. 5.6 eine 1:1-Mischung aus GPΔMLD-mCherry und dem wildtypischen GP in HuH7-Zellen exprimiert und 24 hpt am Lebendzellmikroskop (Nikon TE2000-E) analysiert. Wie erwartet, zeigte das in den MyoVb Tail-Aggregaten gebundene GP kaum Mobilität (Abb. 5.9 C, grüner Kasten, Pfeile; Video 4 + 5), während in der Peripherie auch MyoVb Tail-negative Vesikel beobachtet werden konnten, die weiterhin in der Lage waren, sich über längere Strecken hin zur PM zu bewegen (Abb. 5.9 C, blauer Kasten, Pfeil; Video 4 + 6). Dies spricht dafür, dass die Begegnung des DN MyoVb Tail mit MARV-GP zu einer Immobilisierung des GP führt, die anschließend die beobachteten perinukleären Akkumulation zur Folge haben.

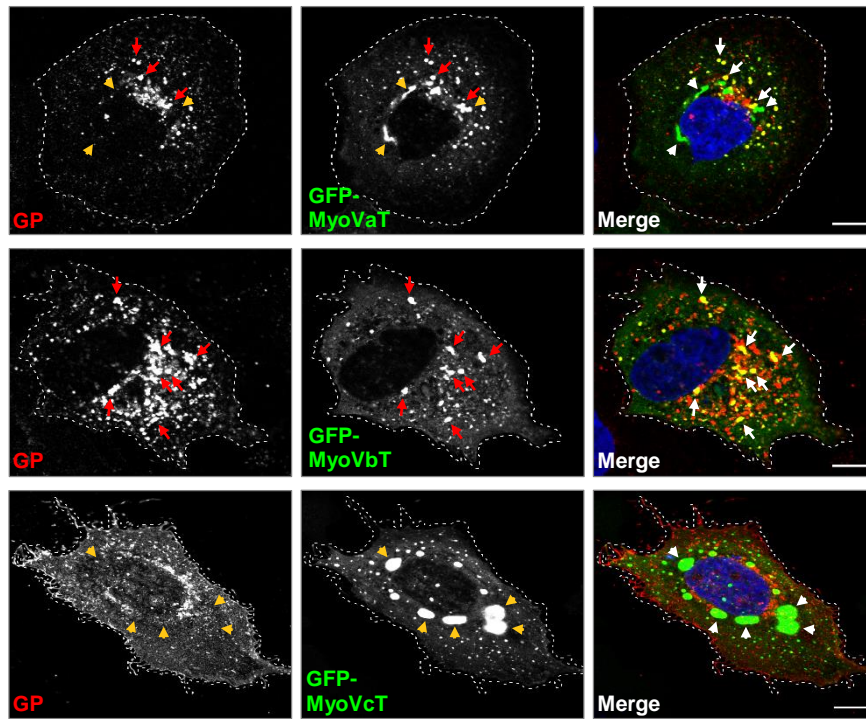
Im Anschluss sollten diese Ergebnisse in MARV-infizierten Zellen bestätigt werden. Dazu wurden die Zellen analog zu dem Versuchsaufbau in 5.1.3 zunächst mit den für GFP bzw. die GFP-MyoV Tail-Konstrukten transfiziert und 4 hpt mit MARV infiziert. Die Fixierung und Färbung erfolgte erneut 24 hpi. Bei Koexpression der MyoV Tail-Mutanten ergab sich ein vergleichbares Bild zu der Situation in transfizierten Zellen. Deutliche Effekte auf die GP-Verteilung hatte insbesondere das MyoVb Tail, das auch in den MARV-infizierten Zellen zu einer Akkumulation von GP im perinukleären Bereich führte, wobei das GP teilweise direkt mit dem MyoVb Tail kolokalisierte und teilweise in unmittelbarer Nachbarschaft detektiert werden konnte (Abb. 5.10 A, mittleres Panel, rote Pfeile). Auch die PM-Färbung war erneut deutlich reduziert. Keine Veränderung hingegen konnte bei Koexpression des MyoVc Tail beobachtet werden (Abb. 5.10 A, unteres Panel, goldene Pfeilköpfe), während das MyoVa Tail erneut zu einem intermediären Phänotyp führte (Abb. 5.10 A, oberes Panel, Pfeile und Pfeilköpfe). Die zusätzliche Expression des mCh-Rab11 führte auch in der Infektion zu einer Kolokalisation von Rab11 mit MyoVa und MyoVb Tail sowie in beiden Fällen zu einer Vergrößerung der perinukleären Aggregate und einem verstärkten Einschluss von GP in diesen Strukturen (Abb. 5.10 B, oberes und mittleres Panel, rote Pfeile). Für das MyoVc konnte der Phänotyp aus transfizierten Zellen ebenfalls bestätigt werden (Abb. 5.10 B, goldene Pfeilköpfe).

Um einen besseren Einblick in das Ausmaß der Assoziation von GP und den drei MyoV Tail-Mutanten, zu bekommen, wurde zusätzlich die Überlagerung von GP und den Myosinen in An- und Abwesenheit von mCh-Rab11 quantifiziert. Um den Fokus dabei ausschließlich auf die MyoV Tail-Aggregate zu legen, wurde erneut eine Objekt-basierte Quantifizierungsmethode gewählt (vgl. Abb. 5.5). Dabei wurden zunächst die MyoV-Aggregate anhand ihrer Größe und Signalintensität segmentiert und anschließend die Überlappung dieser Objekte mit GP geprüft (für Details s. 4.5.2). Myosin-Objekte, die zu mindestens 50 % eine Überlagerung mit GP-Objekten zeigten, wurden dabei als GP-positive Myosin-Aggregate gewertet. Wie in Abb. 5.10 C dargestellt, bestätigte die quantitative Auswertung die visuellen Beobachtungen im Mikroskop. In Abwesenheit von mCh-Rab11 zeigten ca. 68 % der MyoVb und 38 % der MyoVa Tail-Aggregate eine Assoziation mit GP, während dies nur für ca. 3 % der MyoVc-Aggregate zutraf. Bei der zusätzlichen Expression von mCh-Rab11 erhöhte sich die Anzahl der GP-positiven Objekte gar auf jeweils ca. 90 % für MyoVa und MyoVb Tail, während hier ca. 33 % der MyoVc-Aggregate eine Assoziation mit GP zeigten. Im Falle des MyoVc handelte es sich dabei hauptsächlich um die oben beschriebenen Umzirkelungen durch GP.

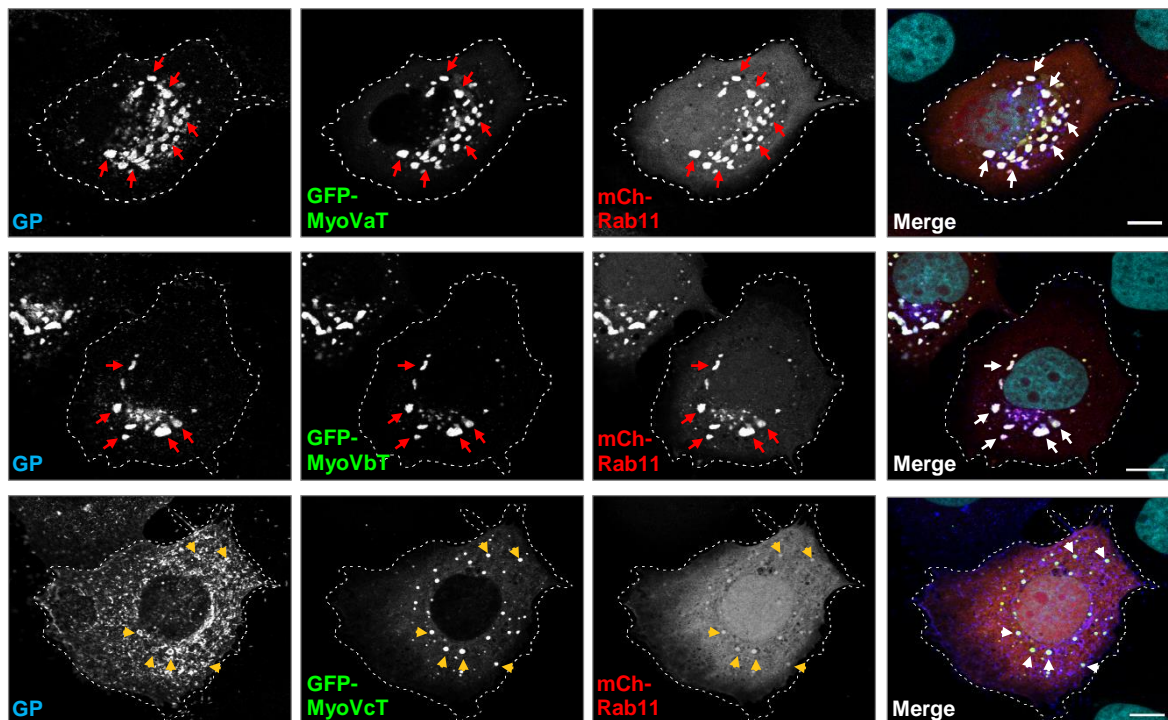
Fasst man die Ergebnisse aus den Abbildungen 5.9 und 5.10 zusammen, konnte gezeigt werden, dass die Expression der DN Tail-Mutante von Myosin Vb zu einer deutlichen Aberration der intrazellulären Verteilung von MARV-GP in transfizierten und MARV-infizierten Zellen führt. Diese äußert sich einerseits in einer Akkumulation von GP in oder um perinukleäre MyoVb Tail-Aggregationen und

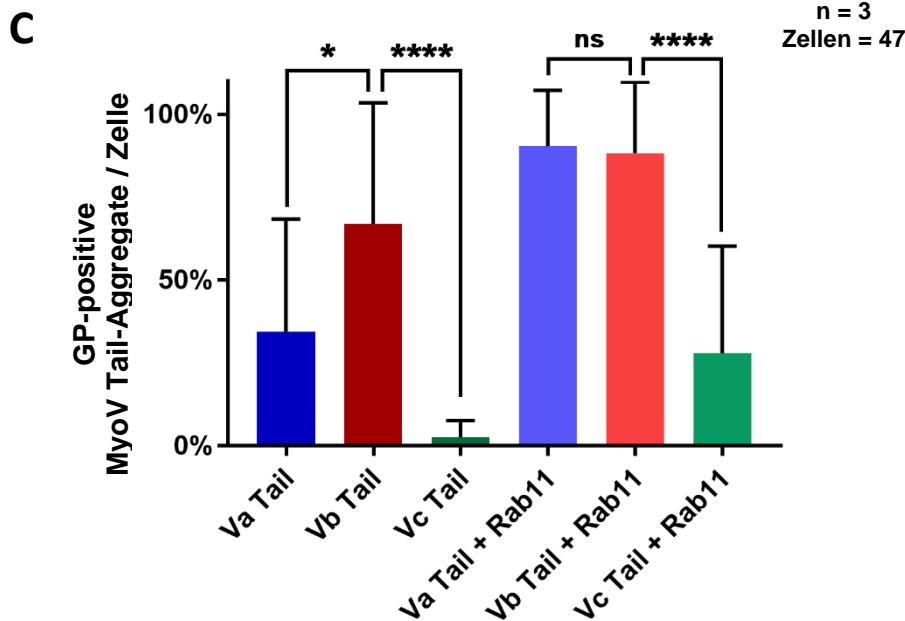


A



B





**Abb. 5.10:** Der Einfluss von von DN MyoVb Tail auf die Verteilung von MARV-GP ist reproduzierbar in MARV-infizierten Zellen.

**(A)** Analyse des Einflusses der DN MyoV Tail-Mutanten auf die Verteilung von MARV-GP in MARV-infizierten Zellen. Subkonfluente HuH7-Zellen wurden zunächst mit pEGFP-MyoVa Tail, pEGFP-MyoVb Tail bzw. pEGFP-MyoVc Tail transfiziert und 4 hpt mit MARV bei einer MOI von 1 infiziert. Nach 24 h wurden die Zellen für 48 h mit 4 % PFA fixiert und anschließend permeabilisiert. Die Färbung von MARV-GP und der Nuclei erfolgte wie in Abb. 5.8 A beschrieben. **(B)** Analyse des Einflusses der DN MyoV Tail-Mutanten auf die Verteilung von MARV-GP in Koexpression mit mCh-Rab11. Subkonfluente HuH7-Zellen wurden zunächst mit mCh-Rab11 sowie pEGFP-MyoVa Tail, pEGFP-MyoVb Tail bzw. pEGFP-MyoVc Tail transfiziert und 4 hpt mit MARV bei einer MOI von 1 infiziert. Nach 24 h wurden die Zellen für 48 h mit 4 % PFA fixiert und anschließend permeabilisiert. Die Färbung von MARV-GP und der Nuclei erfolgte wie in Abb. 5.8 B beschrieben. Rote Pfeile deuten auf Strukturen, die eine Akkumulation von GP und MyoV Tail zeigen, goldene Pfeilköpfe zeigen auf GP-negative MyoVb Tail-Aggregate. Gestrichelte Linien skizzieren die Zellgrenzen. **(C)** Quantitative Analyse der Kolo-kalisation von MARV-GP mit den DN MyoV Tail-Mutanten. Zur Quantifizierung des Ausmaßes der Kolo-kalisation zwischen GP und den MyoV Tail-Mutanten wurde eine Objekt-basierte Kolo-kalisationsanalyse durchgeführt. Dazu wurden zunächst jeweils die GP- bzw. MyoV Tail-Objekte segmentiert und anschließend überprüft, wie viele MyoV Tail-Objekte zu mindestens 50 % mit GP-Objekten überlappen. In die Analyse wurden insgesamt 47 Zellen aus drei unabhängigen Experimenten einbezogen. Aufgetragen sind jeweils die Mittelwerte inklusive SD. Die statistische Analyse erfolgte durch den Kruskal-Wallis-Test. ns; nicht signifikant, \*:  $p \leq 0,05$ , \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ . Maßstabsbalken = 10  $\mu\text{m}$ .

andererseits in einer verminderten Lokalisation an der PM. Die zusätzliche Überexpression von mCh-Rab11 führte zu einer starken Kolo-kalisation von GP, Rab11 und MyoVb Tail und erhöhte die Assoziation von GP und MyoVb Tail (und MyoVa Tail) nochmals erheblich. Diese Beobachtung stützt die These, dass, auch wenn Rab11 keine essentielle funktionelle Bedeutung besitzt, GP und Rab11 zumindest eine Ko-Präsenz in den gleichen Transportstrukturen aufweisen. Zudem ist es vor dem Hintergrund dieser Beobachtungen auch möglich, dass Rab11 keine essentielle, aber eine supportive Rolle im GP-Transport über das RE übernimmt. Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass der Transport von MARV-GP ein Myosin Vb-positives Kompartiment einschließt. Aufgrund der bekannten Rolle von Myosin Vb im Transport von RE sowie der Tatsache, dass mit Rab11 ein weiteres Markerprotein dieses Kompartiments gemeinsam mit GP in den MyoVb Tail-Aggregaten detektiert werden konnte, handelt es sich hierbei sehr wahrscheinlich um das endosomale Recycling-System.

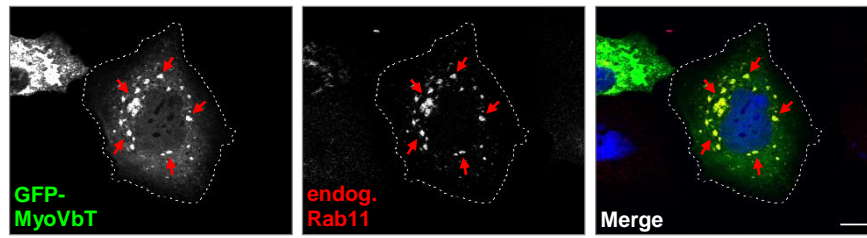
#### 5.2.4 Charakterisierung der Myosin Vb Tail-induzierten perinukleären Aggregationen

In 5.2.3 konnte gezeigt werden, dass die Überexpression des DN MyoVb Tail zu der Bildung von Aggregaten in der perinukleären Region führt und dass sowohl MARV-GP als auch der RE-Marker mCh-Rab11 direkt innerhalb bzw. in unmittelbarer Umgebung von MyoVb Tail akkumulieren. In der Literatur sind diese MyoVb Tail-induzierten Strukturen als Akkumulationen perizentrosomaler Vesikel („*accumulation of [...] pericentrosomal vesicles*“, Lapierre et al., 2001) oder auch als kollabierte Membranzisternen („*collapsed membrane cisternae*“, Roland et al., 2007) beschrieben. Darüber hinaus wurden in unterschiedlichen Studien übereinstimmend Markerproteine des RE in diesen Aggregationen gefunden, was dafür spricht, dass das DN MyoVb Tail eine perinukleäre Aggregation von RE induziert. Um dies im Rahmen des hier verwendeten experimentellen Systems zu überprüfen und gleichzeitig auszuschließen, dass es zu einer unspezifischen Beeinträchtigung anderer zellulärer Kompartimente infolge der Expression von MyoVb Tail kommt, wurden diese Aggregate in der Folge näher charakterisiert. Im Fokus standen dabei insbesondere mögliche Effekte von MyoVb Tail auf andere endosomale Subpopulationen (frühe/späte Endosomen) sowie den Golgi-Apparat als Teil des bekannten Transportwegs von MARV-GP im sekretorischen Pfad.

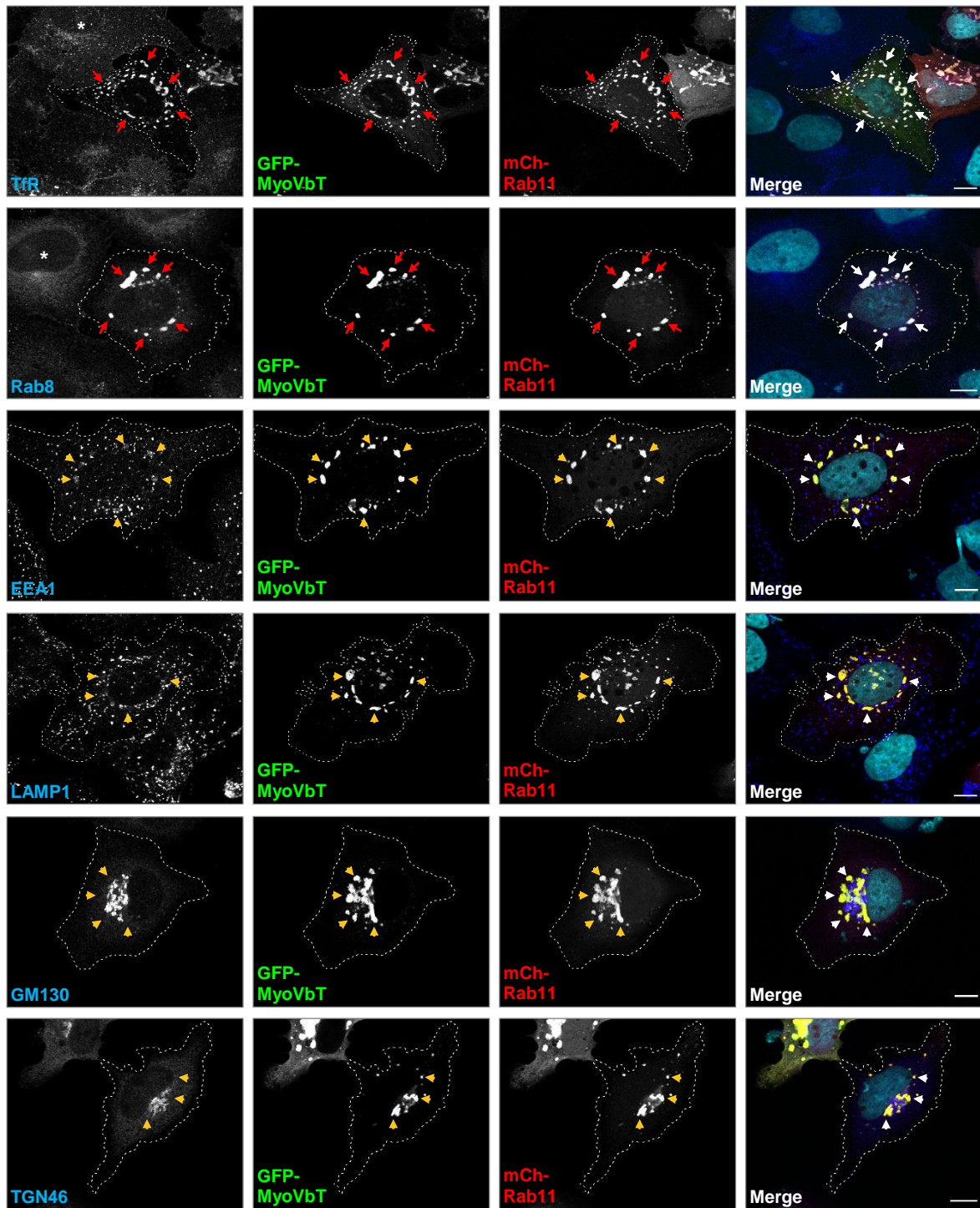
Dazu wurde erneut GFP-MyoVb Tail in HuH7-Zellen überexprimiert, die Zellen 24 hpt fixiert und permeabilisiert sowie anschließend endogene zelluläre Proteine mit entsprechenden Antikörpern gefärbt. Mit Ausnahme der Färbung des endogenen Rab11 wurde außerdem in allen Proben mCh-Rab11 koexprimiert, um stets im Vergleich die Lokalisation von RE bewerten zu können.

Zunächst sollte sichergestellt werden, dass nicht nur das überexprimierte mCh-Rab11, sondern auch das endogene Rab11 in die MyoVb Tail-Aggregationen rekrutiert wird. Wie in Abb. 5.11 A gezeigt, verhielt sich das endogene Rab11 genauso wie das mCh-Rab11 und zeigte ebenfalls eine deutliche Umverteilung in die MyoVb Tail-Aggregationen (Abb. 5.11 A, rote Pfeile). Betrachtet man nun die Effekte von MyoVb Tail auf Markerproteine anderer zellulärer Kompartimente, ist deutlich erkennbar, dass sowohl der TfR als auch Rab8 als Markerproteine des RE die charakteristische Redistribution in die MyoVb Tail-Aggregate zeigen (Abb. 5.11 B, obere zwei Panele, rote Pfeile; *man beachte den Vergleich der Verteilung des TfR und Rab8 zu den mit weißen Sternen markierten MyoVb Tail-negativen Nachbarzellen*). Im Gegensatz dazu zeigten weder Markerproteine des frühen Endosoms (EEA1), des späten Endosoms (LAMP1) noch des *cis*-Golgi- (GM130) bzw. des *trans*-Golgi-Netzwerks (TGN46) eine Akkumulation mit MyoVb Tail. Nur das EEA1 konnte gelegentlich in kleinen Mengen in den MyoVb Tail-Aggregaten detektiert werden. Auch im Hinblick auf die generelle Verteilung der Markerproteine konnte keine Beeinträchtigung festgestellt werden (Abb. 5.11 B, untere 4 Panele, goldene Pfeilköpfe).

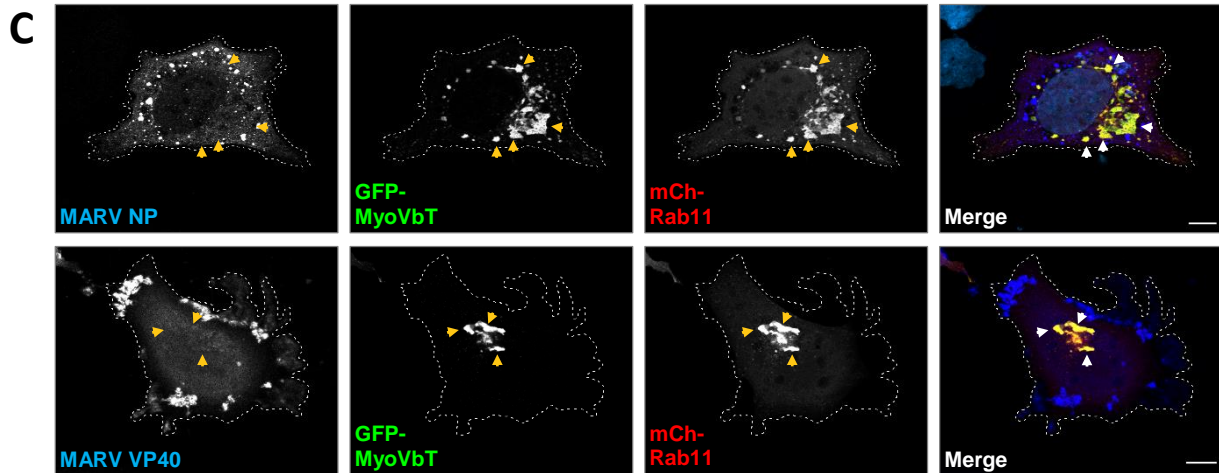
A



B





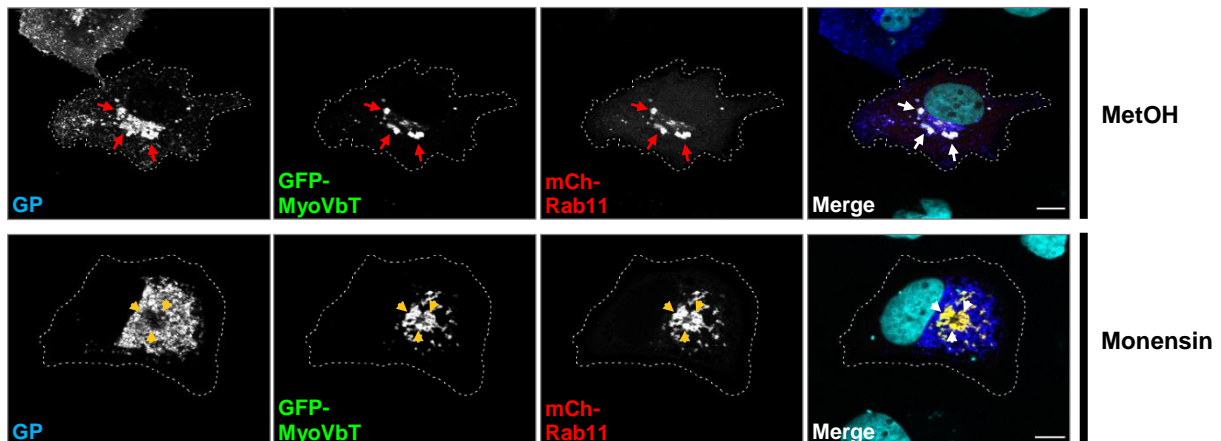


**Abb. 5.11: MyoVb Tail-induzierte Aggregationen kolokalisieren spezifisch mit Recycling Endosomen und enthalten kein MARV-NP oder MARV-VP40.**

**(A)** Untersuchung der Assoziation von MyoVb Tail-induzierten Aggregationen und endogenem Rab11. Subkonfluente HuH7-Zellen wurden mit pEGFP-MyoVb Tail transfiziert und 24 hpt für 48 h mit 4 % PFA fixiert und permeabilisiert. Die Färbung von Rab11 erfolgte mit einem monoklonalen Maus- $\alpha$ -Rab11 IgG in Kombination mit einem Alexa Fluor 594-gekoppelten Ziege- $\alpha$ -Maus IgG-Serum. Die Nuclei wurden mithilfe von DAPI angefärbt. **(B)** Charakterisierung der MyoVb Tail-induzierten Aggregationen mithilfe zellulärer Markerproteine. Subkonfluente HuH7-Zellen wurden mit pEGFP-MyoVb Tail sowie pmCh-Rab11 transfiziert und 24 hpt für 48 h mit 4 % PFA fixiert und permeabilisiert. Die Färbung der endogenen Markerproteine erfolgte mit monoklonalen IgG aus der Maus (TfR, EEA1, LAMP1, GM130) bzw. polyklonalen IgG aus dem Kaninchen (Rab8, TGN46) in Kombination mit Alexa Fluor 647-gekoppelten Ziege- $\alpha$ -Maus bzw. Ziege- $\alpha$ -Kaninchen IgG-Seren. Die Nuclei wurden mithilfe von DAPI angefärbt. **(C)** Analyse des Einflusses der Überexpression des DN MyoVb Tail auf die Verteilung von MARV-NP und MARV-VP40. Subkonfluente HuH7-Zellen wurden mit pEGFP-MyoVb Tail sowie pmCh-Rab11 transfiziert und 24 hpt für 48 h mit 4 % PFA fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurde MARV-NP mit einem monoklonalen IgG aus der Maus (59-9-10) sowie einem mit Alexa Fluor 647-gekoppelten Ziege- $\alpha$ -Maus IgG-Serum gefärbt. Die Färbung von MARV-VP40 erfolgte mithilfe eines polyklonalen  $\alpha$ -MARV-NC IgG aus dem Kaninchen in Kombination mit einem Marina Blue-gekoppelten Ziege- $\alpha$ -Kaninchen IgG-Serum. Die Nuclei wurden mithilfe von DAPI angefärbt, wobei im Falle der Marina Blue-basierten Färbung von VP40 aufgrund der sich überlappenden Fluoreszenzspektren auf die DAPI-Färbung verzichtet wurde. Rote Pfeile deuten auf Strukturen, die eine Akkumulation des Zielproteins (endogene Marker bzw. NP/VP40) in MyoVb Tail-Aggregaten zeigen, goldene Pfeilköpfe zeigen auf entsprechende negative MyoVb Tail-Aggregate. Gestrichelte Linien skizzieren die Zellgrenzen. Maßstabsbalken = 10  $\mu$ m.

Es wird davon ausgegangen, dass der Transport von a) GP, b) VP40 und c) den Nukleokapsiden, bestehend aus NP, L, VP35, VP30 und VP24, unabhängig voneinander verläuft (Schudt et al., 2013; Kolesnikova et al., 2017). In diesem Modell sollte eine spezifische Inhibition des GP-Transports nicht mit dem Transport der anderen Komponenten des MARV interferieren. Daher sollte im nächsten Schritt überprüft werden, ob die Expression von MyoVb Tail einen Einfluss auf die Verteilung des Matrixproteins VP40 bzw. NP als der Hauptkomponente der Nukleokapside besitzt. Dazu wurden HuH7-Zellen mit für GFP-MyoVb Tail sowie MARV-VP40 bzw. MARV-NP kodierenden Plasmiden transfiziert und 24 hpt fixiert, permeabilisiert und gegen VP40 bzw. NP gefärbt. Zusätzlich wurde erneut mCh-Rab11 als Marker für das RE exprimiert. Wie in Abb. 5.11 C zu erkennen, bildeten sich sowohl die peripheren VP40-Cluster als auch die perinukleären NP-positiven Inklusionen in Anwesenheit des MyoVb Tail. Weder VP40 noch NP zeigten dabei eine Kolokalisation mit MyoVb Tail oder eine Veränderung in ihrer Verteilung. Diese Exklusion von VP40 und NP spricht dafür, dass der inhibierende Effekt von MyoVb Tail spezifisch den Transportweg von MARV-GP betrifft.

Die bisherigen Ergebnisse sprechen für ein Modell, in dem MARV-GP zwischen dem Golgi-Apparat und der PM über einen Teil des endosomalen Recycling-Systems transportiert wird, das durch Myosin Vb charakterisiert ist und durch dessen DN Tail-Mutante blockiert werden kann. Um zu bestätigen, dass MARV-GP tatsächlich erst nach Verlassen des Golgi-Apparats in das MyoVb-Kompartiment eintritt, sollte untersucht werden, ob die Akkumulation von GP in den MyoVb Tail-Aggregaten verhindert werden kann, wenn der Transport von GP aus dem Golgi-Apparat blockiert ist.



**Abb. 5.12:** MARV-GP erreicht das MyoVb Tail-Kompartiment in einem *post-Golgi*-Schritt.

Subkonfluente HuH7-Zellen wurden mit pCAGGS-MARV-GP, pEGFP-MyoVb Tail sowie pmCh-Rab11 transfiziert, wobei 4 hpt Methanol (*MetOH*) bzw. 10  $\mu$ M Monensin zum Kulturmedium zugefügt wurde. Nach 20 h wurden die Zellen für 48 h mit 4 % PFA fixiert und anschließend permeabilisiert. Die Färbung von MARV-GP und der Nuclei erfolgte wie in Abb. 5.8 B beschrieben. Rote Pfeile deuten auf Strukturen, die eine Akkumulation von GP und MyoVb Tail zeigen, goldene Pfeilköpfe zeigen auf GP-negative MyoVb Tail-Aggregate. Gestrichelte Linien skizzieren die Zellgrenzen. Maßstabsbalken = 10  $\mu$ m.

Dazu wurden erneut GP, GFP-MyoVb Tail sowie mCh-Rab11 in HuH7-Zellen koexprimiert, wobei 4 hpt das Polyether-Antibiotikum Monensin (bzw. Methanol in der Kontrolle) hinzugegeben wurde, das die Abschnürung von sekretorischen Vesikeln am medialen und *trans*-Golgi-Komplex blockiert (Mollenhauer et al., 1990). Nach 24 h (= 20 h nach Monensin-Zugabe) wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit GP-spezifischen Antikörpern gefärbt. Wie in Abb. 5.12 dargestellt, führte die Monensin-Behandlung zu starken perinukleären Akkumulationen von GP, die jedoch nicht mit den MyoVb Tail- und mCh-Rab11-positiven Aggregaten überlagerten. In den Methanol-behandelten Kontrollzellen zeigte sich hingegen die charakteristische Kolo-kalisation von GP und MyoVb Tail. Aufgrund der Exklusion von GP von den MyoVb Tail-Aggregationen bei Blockade des Austritts aus dem Golgi-Apparat kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass MARV-GP erst nach Verlassen des Golgi-Apparats in das MyoVb-positive Recycling-System eintritt.

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Ergebnissen schließen, dass die Überexpression des DN MyoVb Tail in dem hier verwendeten Zellsystem zu einer spezifischen Aggregation von RE in perinukleären Zellregionen führt, während Struktur und Verteilung von frühen und späten Endosomen sowie des

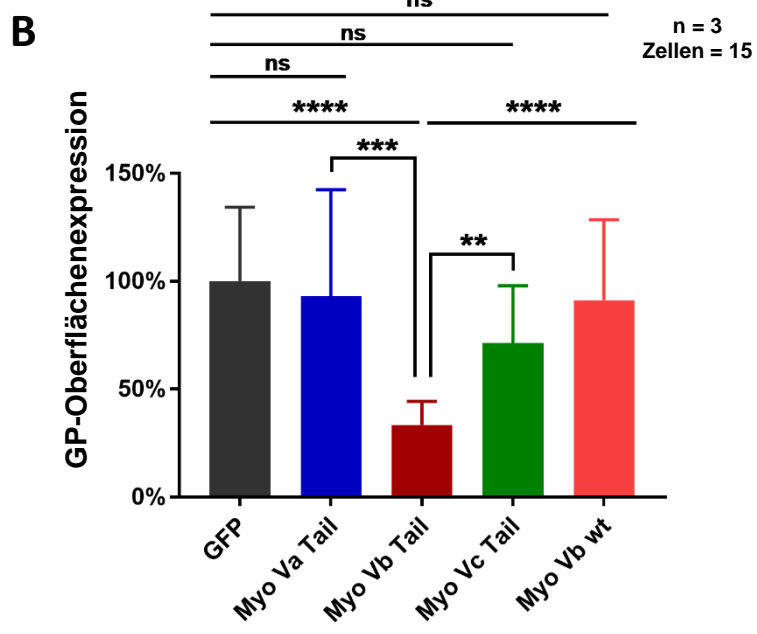
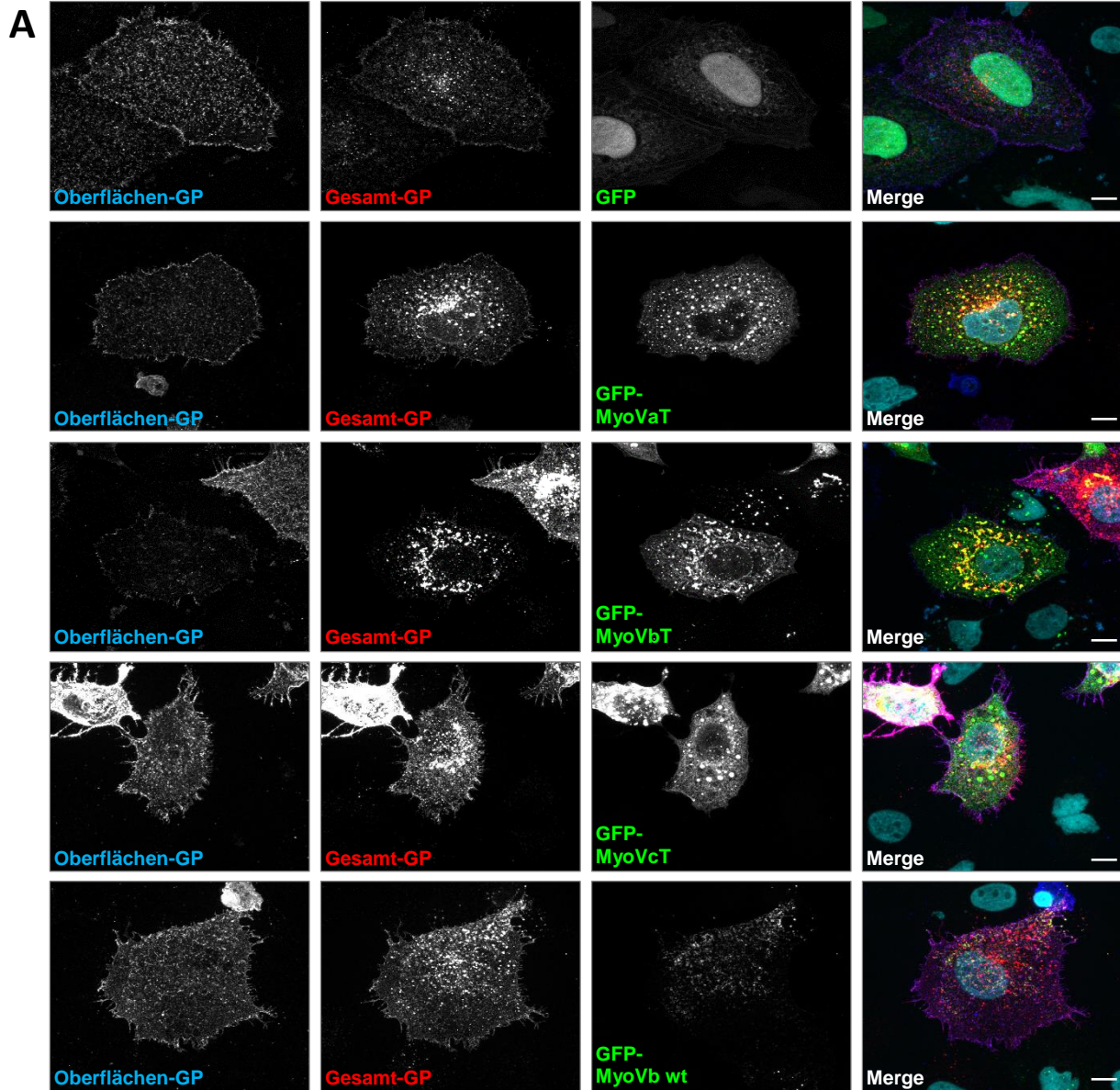
Golgi-Apparats nicht tangiert werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass MARV-GP in einem *post*-Golgi Schritt in das MyoVb-Kompartiment eintritt. Weiterhin sind MARV-VP40 und MARV-NP von den MyoVb Tail-Strukturen exkludiert und weisen eine normale Verteilung auf. Diese spezifische Interferenz von MyoVb Tail mit MARV-GP auf der einen und RE auf der anderen Seite untermauert daher die These, dass GP über dieses Kompartiment transportiert wird.

### 5.2.5 Einfluss der Expression dominant-negativer Mutanten der Myosin V-Familie auf den Transport des Marburg Virus Glykoproteins zur Zelloberfläche

Bei der Analyse der Verteilung von MARV-GP in Koexpression mit dem DN MyoVb Tail konnten im Wesentlichen zwei Beobachtungen gemacht werden: Erstens akkumulierte das GP in oder in der Nähe der perinukleären MyoVb Tail-Aggregate und zweitens schien in der Folge die GP-Intensität an der PM reduziert (5.2.3). Da die Färbung in 5.2.3 jedoch in permeabilisierten Zellen durchgeführt wurde, kann nicht mit völliger Sicherheit eine verlässliche Aussage über die Oberflächenlevel getroffen werden. Aus diesem Grund sollte analog zur Rab11-Depletion (5.2.2) mittels IFA sowie einem OBA geprüft werden, ob die Expression des MyoVb Tail zu einer Inhibition des GP-Transports zur Zelloberfläche führt.

Für die IF-basierten Analyse wurden dazu MARV-GP mit GFP, den GFP-MyoV Tails oder dem GFP-gekoppelten wildtypischen Myosin Vb in HuH7-Zellen koexprimiert. Nach 24 h wurde das Oberflächen-GP nativ mit einem ersten Primär-Antikörper gefärbt, bevor die Zellen fixiert und permeabilisiert wurden. Um die Oberflächenlevel in Relation zur Gesamtexpression setzen zu können, wurde im Anschluss mit einem zweiten Primär-Antikörper das gesamte GP (Oberfläche und intrazellulär) angefärbt und schließlich beide Populationen mit unterschiedlichen Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert. Da die Zelloberfläche aufgrund der Plastizität der Zellen oft in verschiedenen mikroskopischen Ebenen lokalisiert ist, kann ein zweidimensionaler Schnitt durch die Zelle nicht immer die tatsächliche Intensitätsverteilung erfassen. Um dennoch keine Informationen zu verlieren und eine akkurate Analyse zu gewährleisten, wurden am KLSM sog. Z-Stapel aufgenommen. Diese beinhalteten insgesamt 15 einzelne Schnitte pro Zelle bei einer Schichtdicke von je 420 nm, die alle Zellen vom tiefsten bis zum höchsten Punkt abdeckten. Für die quantitative Analyse wurden in jedem dieser Schnitte sowohl die Intensität des Oberflächen-GP als auch die des Gesamt-GP gemessen und anschließend die addierten Werte des Oberflächen-GP durch die des addierten Gesamt-GP dividiert. In Abb. 5.13 A ist für jede Probe ein repräsentativer Z-Stapel in Form einer Maximumintensitätsprojektion dargestellt, die jeweils das intensitätsstärkste Pixel aus allen verfügbaren Stapeln anzeigt und so ein Übersichtsbild der dreidimensionalen Verteilungen generiert. In der GFP-exprimierenden Kontrollzelle ist bei der Gesamt-GP-Färbung erneut die klassische GP-Verteilung zu erkennen, die vor





**Abb. 5.13: Die Expression des DN MyoVb Tail führt zu einer Reduktion von MARV-GP an der Zelloberfläche (IFA).**

**(A)** Analyse der Oberflächenexpression von MARV-GP in Anwesenheit der MyoVb Tail-Mutanten mittels IFA. Subkonfluente HuH7-Zellen wurden mit pCAGGS-MARV-GP sowie pEGFP, pEGFP-MyoVa Tail, pEGFP-MyoVb Tail, pEGFP-MyoVc Tail bzw. pEGFP MyoVb transfiziert. Nach 24 h wurde das GP an der Oberfläche nativ bei 4 °C mit einem polyklonalen Kaninchen- $\alpha$ -GP IgG-Serum (95/6) markiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und das gesamte GP mittels eines zweiten  $\alpha$ -GP Primärantikörpers aus der Maus (31-11-9) angefärbt. Als Sekundärantikörper dienten ein Ziege- $\alpha$ -Kaninchen IgG-Serum gekoppelt an Alexa Fluor 647 bzw. ein Alexa Fluor 568-konjugiertes Ziege- $\alpha$ -Maus IgG-Serum. Die Nuclei wurden mithilfe von DAPI angefärbt. Die dargestellten Bilder zeigen Maximumintensitätsprojektionen von repräsentativen konfokalen Z-Stapelaufnahmen mit jeweils 15 Stapeln und einer Schnittdicke von 420 nm. **(B)** Quantitative Analyse der Oberflächenexpression von MARV-GP. Für die Quantifizierung der GP-Oberflächenlevel wurde in jeder Ebene einer Z-Stapelaufnahme die Intensität der Fluoreszenzsignale in Form der „integrierten Dichte“ („*integrated density*“ in der Software ImageJ/Fiji) sowohl für das Gesamt-GP als auch für das Oberflächen-GP gemessen. Zu Berechnung der relativen Oberflächenexpression wurden die addierten Werte des Oberflächen-GP durch die addierten Werte des Gesamt-GP dividiert. Aufgetragen sind jeweils die Mittelwerte inklusive SD, dabei wurde der Mittelwert der GFP-Kontrolle gleich 100 % gesetzt. Insgesamt wurden jeweils 15 Z-Stapel aus drei unabhängigen Experimenten analysiert. Die statistische Analyse erfolgte durch den Kruskal-Wallis-Test. \*\*:  $p \leq 0,01$ , \*\*\*:  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ . Maßstabsbalken = 10  $\mu$ m.

allem auch eine definierte Färbung der Zellgrenzen mit einschließt (Abb. 5.13 A, oberes Panel, zweite Spalte). Die starke Oberflächenexpression wird noch deutlicher bei Betrachtung der nativen Färbung, die zudem wie erwartet nahezu vollständig mit Signalen der Gesamtfärbung überlagert (Abb. 5.13 A, oberes Panel, erste Spalte). Auch bei der Koexpression der MyoV Tail-Mutanten bestätigt sich das Bild aus 5.2.3. Während im Falle des DN MyoVc Tail weder ein signifikanter Einfluss auf die GP-Verteilung noch auf die Stärke des Oberflächensignals beobachtet werden konnte, führte die Expression des DN MyoVb Tail zu einer Akkumulation von GP im Bereich der perinukleären MyoVb Tail-Aggregate sowie insbesondere zu einer deutlichen Reduktion der Oberflächenfärbung (Abb. 5.13 A, drittes und viertes Panel). Beim MyoVa Tail erfolgte zwar auch hier erneut eine partielle Redistribution von GP in die perinukleären Aggregate, die Oberflächenlevel waren jedoch im Gegensatz zum MyoVb Tail nicht merklich reduziert (Abb. 5.13 A, zweites Panel). Um zu kontrollieren, dass die Effekte des MyoVb Tail tatsächlich durch dessen DN Phänotyp bedingt ist, wurden zusätzlich Zellen analysiert, die MARV-GP sowie das vollständige (wildtypische) Myosin Vb exprimierten (Abb. 5.13 A, fünftes Panel). Auch hier zeigte sich eine klassische GP-Verteilung mit normaler Oberflächenexpression. Zudem konnte eine Kollokalisierung von GP und Myosin Vb in punktförmigen Vesikeln sowie in peripheren Bereichen in Nähe der PM beobachtet werden. Auch die quantitative Analyse stimmt mit diesen Beobachtungen überein und zeigt eine signifikante Reduktion des Oberflächen-GP von ca. 77 % bei Expression des MyoVb Tail im Vergleich zu den GFP-exprimierenden Kontrollzellen, während weder die Überexpression von MyoVa noch von MyoVc Tail zu signifikanten Veränderungen gegenüber den GFP-Kontrollzellen führte (Abb. 5.13 B). Auch im Vergleich mit Zellen, die das wildtypische Myosin Vb bzw. entweder MyoVa oder MyoVc Tail exprimierten, ergab sich eine signifikante Verminderung der Oberflächenexpression durch das MyoVb Tail.

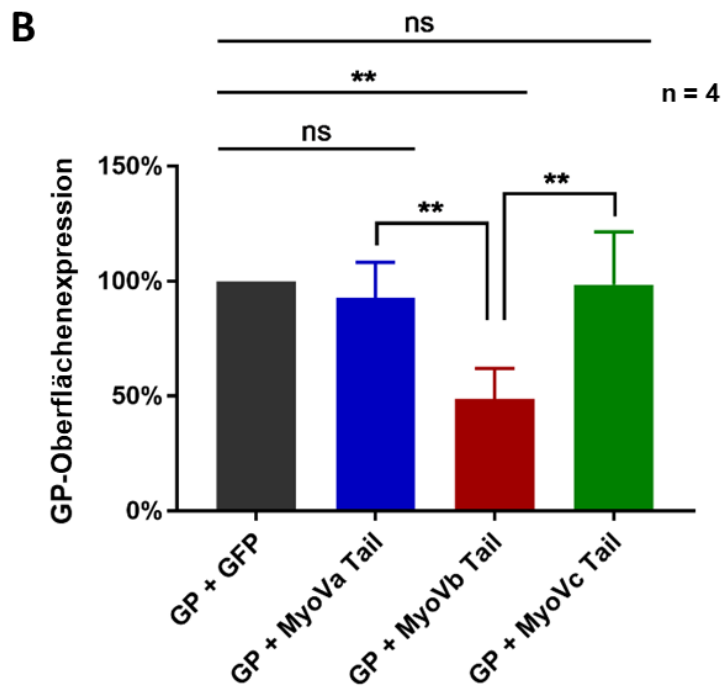
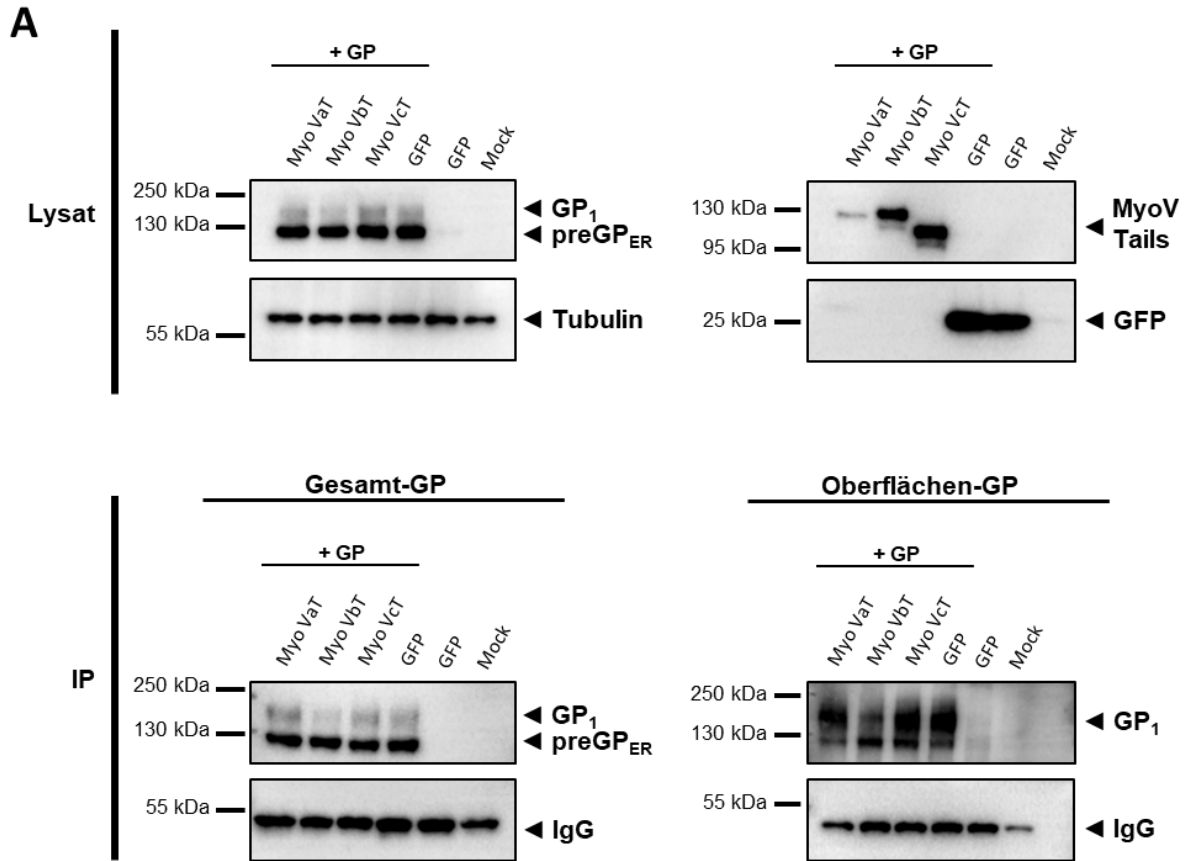
Zur Bestätigung der Ergebnisse der quantitativen IFA wurde mit dem OBA eine weitere Methode zur Untersuchung der GP-Oberflächenlevel verwendet, die auch schon im Falle der Rab11-Depletion

eingesetzt wurde (s. 5.2.2). Die Zellen wurden dabei mit für MARV-GP sowie GFP bzw. den GFP-gekoppelten MyoV Tail-Mutanten kodierenden Plasmiden transfiziert, bevor 24 hpt die OBA wie in 5.2.2 beschrieben durchgeführt wurde. In Abb. 5.14 A ist eine repräsentative Western Blot-Färbung dargestellt. Mit Hinblick auf die Expression der verschiedenen MyoV Tail-Mutanten in der Lysat-Probe wies das MyoVa Tail deutlich reduzierte Proteinmengen als die ungefähr gleich stark exprimierten MyoVb und MyoVc Tail auf. Da die transfizierte Menge an DNA in diesem Versuch jedoch schon relativ hoch war und toxische Mengen vermieden werden sollten, wurde die Plasmidmenge nicht weiter erhöht. Die Ergebnisse des MyoVa Tail müssen daher mit Vorsicht interpretiert werden.

Betrachtet man die Färbung von MARV-GP konnten vergleichbare Expressionslevel im Zelllysatsowie auch vergleichbare Mengen an präzipitiertem GP in der IP-Probe detektiert werden. Auch in der Streptavidin-Färbung wiesen die GFP sowie GFP-MyoVa bzw. MyoVc Tail exprimierenden Zellen gleiche Mengen an Oberflächen-GP auf. Einzig im Falle der Expression von MyoVb Tail zeigte sich eine deutlich schwächere Bande. Auch hier konnte teilweise in der Streptavidin-Färbung eine leichte Bande auf Höhe des preGP<sub>ER</sub> detektiert werden, die, wie bereits in 5.2.2 diskutiert, vermutlich durch abgelöste Zellen während des Biotinylierungsschritts auftrat. Für die Quantifizierung wurde wie in 5.2.2 nur die GP<sub>1</sub>-Bande herangezogen.

In der quantitativen Auswertung von vier unabhängigen Experimenten zeigte sich ungefähr eine Halbierung der Oberflächenexpression von GP im Vergleich zu den GFP-Kontrollzellen, die zudem eine statistische Signifikanz gegenüber den GFP- sowie auch den MyoVa bzw. MyoVc Tail-exprimierenden Zellen besaß (Abb. 5.14 B). Diese deutliche Reduktion des Oberflächen-GP im OBA ist umso bemerkenswerter, wenn man sich vor Augen hält, dass es sich hier um eine Massenanalyse von mindestens mehreren Hunderttausend einzelner Zellen handelt (300,000 ausgesäte Zellen am Tag vor der Transfektion), von denen vermutlich nur ein Teil sowohl MARV-GP als auch genügend MyoVb Tail für einen DN Effekt exprimierte – auf Basis der Erfahrungen aus der IFA kann dieser Anteil grob auf etwa 20-40 % geschätzt werden. Dass dennoch eine Halbierung des Oberflächen-GP festgestellt werden konnte, spricht daher für einen starken inhibierenden Effekt des MyoVb Tail auf den Transport von MARV-GP. Interessanterweise kann bei genauer Betrachtung der Gesamt-GP-Färbung sowohl in den Lysaten als auch in der IP im Falle der MyoVb Tail-Proben eine etwas schwächere GP<sub>1</sub>-Bande bei unveränderter preGP<sub>ER</sub>-Bande festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass ein Teil des infolge der MyoVb Tail-Expression intrazellulär akkumulierenden GP degradiert wird.

Fasst man die Ergebnisse der Analyse der Oberflächenexpression von MARV-GP in Anwesenheit der DN MyoV Tail-Mutanten zusammen, zeigt sich in Zellen, die das DN MyoVb Tail exprimierten, sowohl in der quantitativen IFA als auch im OBA eine deutliche und statistisch signifikante Reduktion der GP-Menge an der Zelloberfläche. Diese Ergebnisse bestätigen damit den Eindruck, der sich bereits in 5.2.3



**Abb. 5.14: Die Expression des DN MyoVb Tail führt zu einer Reduktion von MARV-GP an der Zelloberfläche (OBA).**

**(A)** Analyse der Oberflächenexpression von MARV-GP in Anwesenheit der MyoVb Tail-Mutanten mittels Oberflächenbiotinylierungs-Assay. Subkonfluente HuH7-Zellen wurden mit pCAGGS-MARV-GP sowie pEGFP, pEGFP-MyoVa Tail, pEGFP-MyoVb Tail bzw. pEGFP-MyoVc Tail transfiziert. Weitere Kontrollzellen wurden nur mit pEGFP bzw. mit pCAGGS-Leervektor (= Mock) transfiziert. Nach 24 h wurden die Proteine an der Zelloberfläche für 30 min bei 4 °C mit Sulfo-NHS-Biotin markiert und anschließend die Zellen geerntet und lysiert. Ein Teil des Ausgangsmaterials wurde für die Färbung der Lysate abgenommen und anschließend das GP in der restlichen Probe mittels Protein A-Sepharose und eines monoklonalen Maus- $\alpha$ -MARV-GP IgG (50-6-10) präzipitiert (= IP). Sowohl die Lysat- als auch die IP-Proben wurden in der Folge einer SDS-PAGE und einer Western Blot-Analyse unterzogen und das vorhandene Gesamt-GP mittels eines monoklonalen Maus- $\alpha$ -MARV-GP IgG (50-6-10) in Kombination mit einem HRP-gekoppelten Ziege- $\alpha$ -Maus IgG-Serum gefärbt. Das Biotin-markierte Oberflächen-GP wurde mit HRP-konjugiertem Streptavidin markiert. Die Chemilumineszenz-basierte Detektion erfolgte am ChemiDoc System (BioRad). Dargestellt sind Aufnahmen von Western Blots eines repräsentativen Experiments aus insgesamt vier unabhängigen Versuchen. **(B)** Quantifizierung der Oberflächen-Expressionslevel von GP. Zur Quantifizierung wurde jeweils die Bandenstärke des Gesamt-GP sowie des Oberflächen-GP bestimmt und auf die IgG-Level normalisiert. Anschließend wurden die relativen Oberflächenlevel durch Division des normalisierten Oberflächen-GP durch das normalisierte Gesamt-GP kalkuliert. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten inklusive SD, wobei die relativen Oberflächenlevel der GFP-exprimierenden Kontrollzellen auf 100 % gesetzt wurden. Die statistische Auswertung erfolgte durch Student's t-Test mit Welch-Korrektur. ns: nicht signifikant, \*\*:  $p \leq 0,01$ .

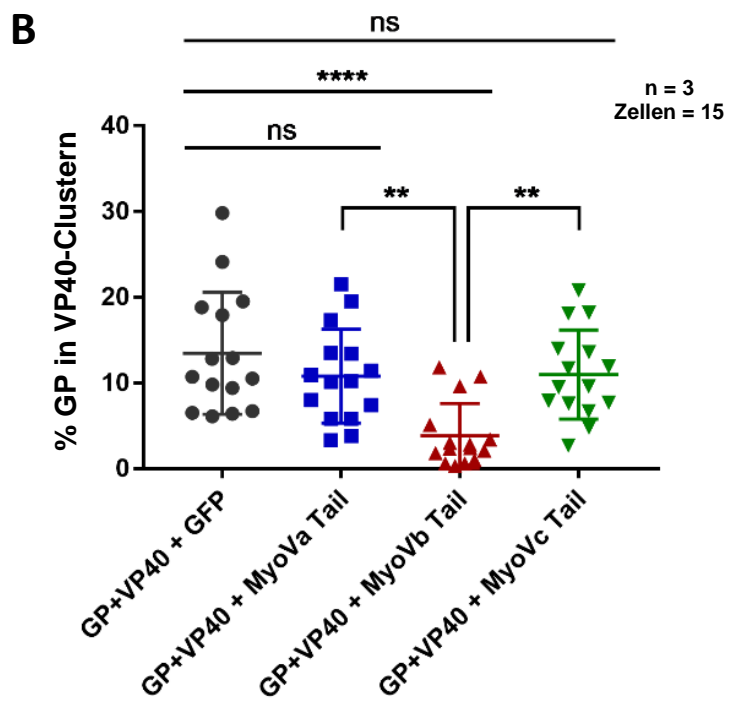
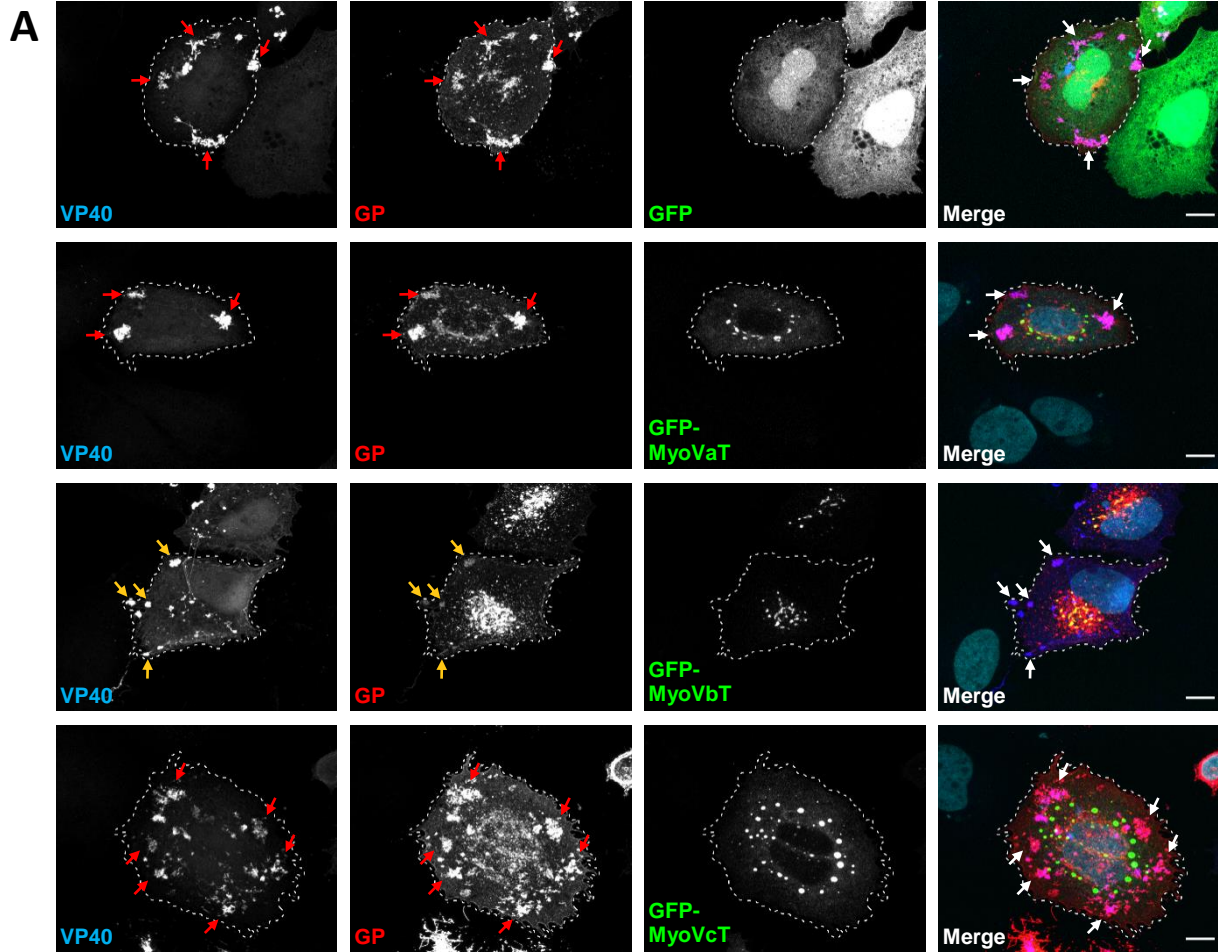
im Hinblick auf die veränderte Verteilung von GP bei Koexpression von MyoVb Tail ergeben hatte. Verknüpft man diese Erkenntnisse mit der Charakterisierung der MyoVb Tail-Aggregate in 5.2.4, kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Überexpression des DN MyoVb Tail eine Blockierung des Transports von Proteinen des RE bewirkt und die Beeinträchtigung dieses spezifischen Transportwegs in der Folge zu einer Inhibition des *post*-Golgi Transports von MARV-GP in Richtung PM führt. Dies schließlich spricht deutlich dafür, dass MARV-GP während seiner Beförderung zur Zelloberfläche das zelluläre Recycling-System durchschreitet.

### 5.2.6 Einfluss der Expression dominant-negativer Mutanten der Myosin V-Familie auf den Transport des Marburg Virus-Glykoproteins zu VP40-reichen Membranclustern

In 5.1.2 wurde bereits auf die Assoziation von GP mit VP40 in Membranclustern an der PM eingegangen. Diese Zusammenkunft von GP und VP40 an der PM als Ort des „*Buddings*“ von neuen Viruspartikeln stellt einen essentiellen Schritt im Assemblierungsprozess des MARV dar, ohne den keine infektiösen Virionen gebildet werden können. Aus diesem Grund war es naheliegend zu prüfen, ob die Expression des DN MyoVb Tail nicht nur die generelle Beförderung von GP zur Zelloberfläche, sondern auch den spezifischen Transport in die VP40-reichen Membrancluster inhibiert. Zur Untersuchung dieser Frage wurde eine quantitative IFA durchgeführt, in der die Menge an GP in den VP40-Clustern in An- bzw. Abwesenheit der DN MyoV Tail-Mutanten gemessen wurde.

Dazu wurden GFP bzw. die GFP-gekoppelten MyoV Tail-Mutanten gemeinsam mit GP und VP40 in HuH7-Zellen koexprimiert und die Zellen 24 hpt fixiert, permeabilisiert und gegen GP und VP40 gefärbt. Aufgrund der Morphologie der VP40-Cluster, die oft eine Höhe von einigen Mikrometern erreichten,





**Abb. 5.15:** Die Expression des DN MyoVb Tail führt zu einer Reduktion der Assoziation von MARV-GP mit peripheren VP40-Clustern.

**(A)** Analyse der Assoziation von MARV-GP mit peripheren VP40-Clustern in Anwesenheit der MyoVb Tail-Mutanten. Subkonfluente HuH7-Zellen wurden mit pCAGGS-MARV-GP, pCAGGS-MARV-VP40 sowie pEGFP, pEGFP-MyoVa Tail, pEGFP-MyoVb Tail bzw. pEGFP-MyoVc Tail transfiziert und 24 hpt für 48 h mit 4 % PFA fixiert und permeabilisiert. Die Färbung erfolgte mit einem monoklonalen Maus- $\alpha$ -MARV-GP IgG-Primärantikörper (31-11-9) in Kombination mit einem Alexa Fluor 568-gekoppelten Ziege- $\alpha$ -Kaninchen IgG-Serum sowie einem polyklonalen Kaninchen- $\alpha$ -MARV-NC IgG in Kombination mit einem Alexa Fluor 647-konjugierten Ziege- $\alpha$ -Kaninchen IgG-Serum. Nuclei wurden mithilfe von DAPI angefärbt. Die dargestellten Bilder zeigen Maximumintensitätsprojektionen von repräsentativen konfokalen Z-Stapel aufnahmen mit jeweils 13 Stapeln und einer Schnittdicke von 420 nm. Pfeile deuten auf GP in VP40-Cluster-Strukturen. **(B)** Quantitative Analyse der Cluster-Assoziation von MARV-GP. Für die Quantifizierung der GP-Mengen in den VP40-Clustern wurden mithilfe des „3D Suite“ Plugin für ImageJ/Fiji zunächst die VP40-Cluster als dreidimensionale Zielobjekte segmentiert und anschließend die Fluoreszenzintensität in Form der „integrierten Dichte“ („integrated density“) sowohl für das Gesamt-GP in der Zelle als auch spezifisch für das GP innerhalb der Cluster gemessen. Zu Berechnung der relativen Cluster-Assoziation wurden die Messwerte des Cluster-assoziierten GP durch die Messwerte des Gesamt-GP dividiert. Aufgetragen sind jeweils die Mittelwerte inklusive SD. Insgesamt wurden jeweils 15 Z-Stapel aus drei unabhängigen Experimenten analysiert. Die statistische Analyse erfolgte durch den 1-Weg ANOVA-Test. \*\*:  $p \leq 0,01$ , \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ . Maßstabsbalken = 10  $\mu$ m.

wurden wie bereits in der quantitativen IFA in 5.2.4 Z-Stapel aufgenommen, um die gesamte Bandbreite der Fluoreszenzsignale über alle Fokusebenen der Zelle abzubilden. In diesem Fall wurden pro Zelle jeweils 13 Schnitte mit einer Dicke von je 420 nm aufgenommen. In Abb. 5.15 sind Maximumintensitätsprojektionen von jeweils repräsentativen Z-Stapeln abgebildet.

Im Falle einer Koexpression von GP, VP40 und GFP bildeten sich die charakteristischen VP40-reichen Cluster an der PM, die zudem eine starke Anreicherung mit GP aufwiesen (Abb. 5.15 A, oberes Panel, rote Pfeile). Dieser Phänotyp konnte ebenso in MyoVa und MyoVc Tail-exprimierenden Zellen beobachtet werden (Abb. 5.15 A, zweites bzw. viertes Panel, rote Pfeile). In Zellen hingegen, die das DN MyoVb Tail exprimierten, zeigte sich eine deutliche Reduktion der GP-Intensität in den VP40-Clustern (Abb. 5.15 A, drittes Panel, goldene Pfeile). Um diese Beobachtung auch quantitativ zu bestätigen, wurde eine dreidimensionale Quantifizierung der GP-Mengen in den VP40-Clustern durchgeführt. Dazu wurden zunächst mithilfe des „3D Suite“-Plugins für ImageJ/Fiji (Ollion et al., 2013) die VP40-Cluster als Zielobjekte segmentiert und anschließend die GP-Intensität innerhalb der Cluster sowie in der gesamten Zelle gemessen. Anschließend wurde die Intensität des Cluster-assoziierten GP durch die Intensität des Gesamt-GP dividiert, um die relative Menge an GP in den VP40-Clustern zu erhalten (s. 4.5.3). Wie in Abb. 5.15 B gezeigt, konnte in den GFP-exprimierenden Zellen ca. 13 % des gesamten GP-Signals in den VP40-Clustern detektiert werden. Dieser Wert blieb in den MyoVa bzw. MyoVc Tail-exprimierenden Zellen relativ stabil bei ca. 11 %, reduzierte sich jedoch in Anwesenheit von MyoVb Tail um etwa 72 % auf nur noch 4 % Cluster-assoziiertes GP. Dieser Wert zeigte dabei eine statistische Signifikanz im Vergleich zu den drei anderen Proben.

Diese Resultate zeigen, dass die Überexpression des DN MyoVb Tail nicht nur generell den Transport von MARV-GP zur PM inhibiert, sondern auch den spezifischen Transport zu den VP40-reichen Membranclustern. Aufgrund der essentiellen Bedeutung der Zusammenkunft von GP und VP40 an der



PM im Vorfeld der Formation der viralen Hülle, ist die Interferenz des DN MyoVb Tail mit diesem Prozess ein Hinweis darauf, dass der Transport von GP über das Myosin Vb-positive Recycling-System vermutlich eine substanzielle Komponente des Transport- und Assemblierungsprozesses des MARV darstellt.

### **5.3 Vergleich des Transports des Marburg Virus-Glykoproteins mit anderen Oberflächenproteinen verschiedener Negativstrang-RNA-Viren**

Verschiedene Viren haben im Laufe der Evolution unterschiedliche Replikationsstrategien entwickelt. Da alle Viren dabei als obligat intrazelluläre Parasiten auf eine Wirtszelle angewiesen sind, müssen sie gewährleisten, dass die viralen Strukturproteine, die für die Zusammensetzung neuer Replikate benötigt werden, korrekt zum Ort der Assemblierung in der Zelle transportiert werden. Der intrazelluläre Transport des Oberflächenproteins GP des MARV lässt sich dabei anhand von drei wesentlichen Merkmalen charakterisieren. Erstens beginnt der Transport von GP mit der Synthese im ER und der anschließenden Beförderung über den sekretorischen Pfad zum Golgi-Apparat (Becker et al., 1996). Zweitens endet er an der PM, an der es in Anwesenheit von MARV-VP40 zu einer Anreicherung in VP40-reichen Membranclustern kommt (Becker et al., 1996; Kolesnikova et al., 2004b). Drittens verläuft der Transport zwischen dem Golgi-Apparat und der PM durch ein Myosin Vb-positives Kompartiment und kann durch die Überexpression des DN MyoVb Tail blockiert werden (diese Arbeit). Vergleicht man MARV-GP mit Oberflächenproteine anderer Negativ-Strang-RNA-Viren, lässt sich feststellen, dass es sich hierbei stets um Transmembranproteine handelt, deren Transport zunächst äquivalent mit MARV-GP verläuft (ER-Synthese und Golgi-Passage). Unklar ist hingegen, ob alle diese viralen Oberflächenproteine die Affinität von MARV-GP zu den VP40-reichen Regionen an der PM teilen und ob deren Transport ebenfalls durch das DN MyoVb Tail inhibiert werden kann oder ob diese Eigenschaften spezifisch für den Transport von MARV-GP sind. Aus diesem Grund wurden im letzten Teil dieser Arbeit die in Tabelle 5.3 aufgeführten viralen Oberflächenproteine auf ihre Assoziation mit MARV-VP40-reichen Membranclustern sowie die Sensitivität gegenüber des DN MyoVb Tail getestet. Die Proteine wurden dabei so ausgewählt, dass möglichst verschiedene Eigenschaften wie z.B. die Grundstruktur (Typ I / Typ II-Transmembranprotein) oder die Lokalisation in polarisierten Zellen (apikal/basolateral) vertreten waren.

**Tabelle 5.3**

Überblick über die analysierten viralen Oberflächenproteine

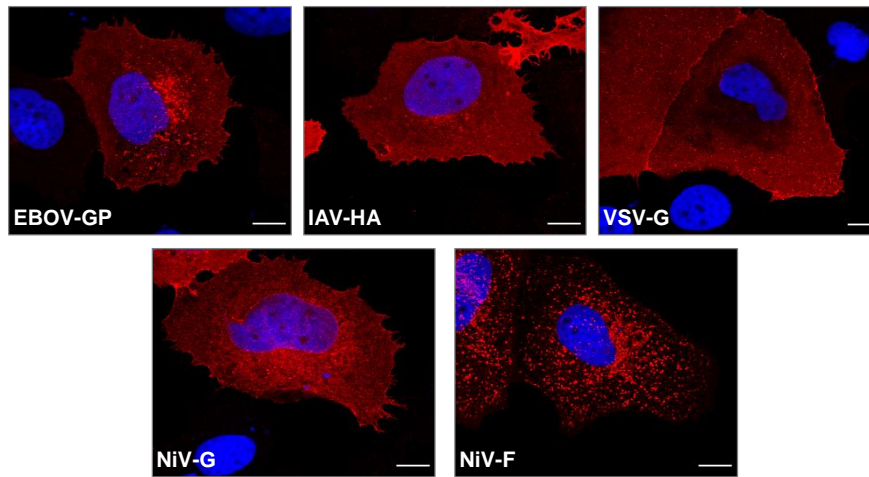
Oberflächenprotein	Transmembranprotein	Lokalisation in polarisierten Zellen	Re-Endozytose von der PM	Assoziation mit MARV-VP40-Clustern	Akkumulation in MyoVb Tail/mCh-Rab11-Aggregaten
MARV-GP	Typ I [1]	apikal [2]	- [s. Abb. 5.2]	++	++
EBOV-GP	Typ I [3]	vermutlich apikal [2]	?	++	++
IAV-HA	Typ I [4]	apikal [5]	- [6]	++	++
VSV-G	Typ I [7]	basolateral [8]	+ [6]	++	+/-
NiV-G	Typ II [9]	basolateral [10]	+ [11]	++	++
NiV-F	Typ I [9]	basolateral [10]	++ [11]	-	+/-

*blau markierte Informationen stammen aus dieser Arbeit*Referenzen:

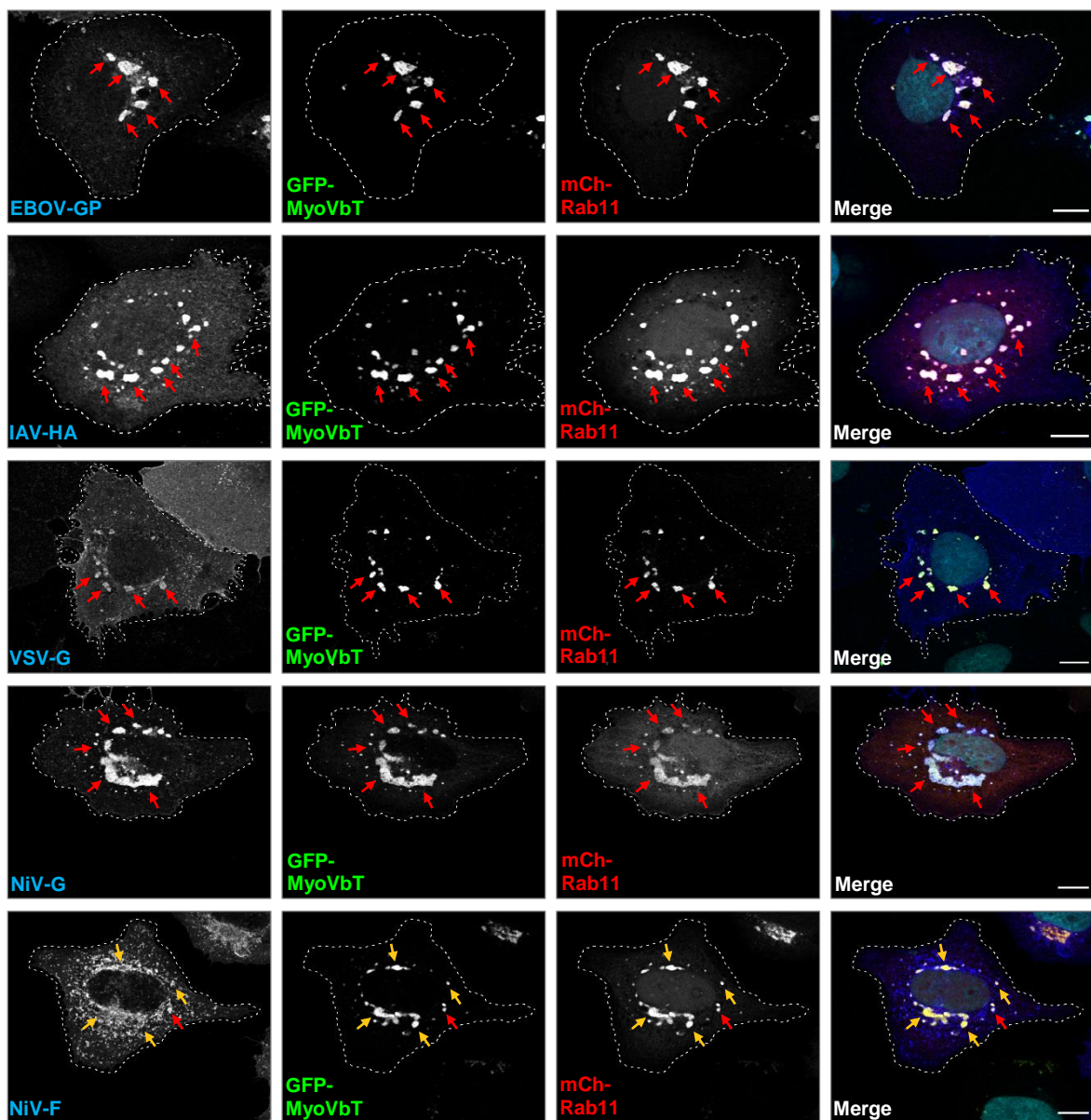
1 - Will et al. (1993)	4 - Wilson et al. (1981)	7 - Rose et al. (1980)	10 - Weise et al. (2010)
2 - Kolesnikova et al. (2007b)	5 - Roth et al. (1983)	8 - Thomas et al. (1993)	11 - Vogt et al. (2005)
3 - Volchkov et al. (1998)	6 - Lazarovits et al. (1996)	9 - Diederich & Maisner (2007)	

Zum Vergleich der Standardverteilung erfolgte zunächst eine solitäre Färbung der Oberflächenproteine (Abb. 5.16 A). Dabei konnten in allen Fällen mit Ausnahme des NiV-F eine deutlich ausgeprägte Färbung der Zelloberfläche sowie punktförmige Vesikel beobachtet werden. Im Falle des NiV-F war nur gelegentlich eine PM-Färbung erkennbar, stattdessen lokalisierte das F in einer Vielzahl von sphärischen Vesikeln (vgl. auch Abb. 5.2). Die Verteilungen entsprachen insgesamt bisherigen Berichten über diese Proteine, sodass von einem unbeeinträchtigten Transport ausgegangen werden kann. Anschließend sollte geprüft werden, ob der Transport der viralen Oberflächenproteine wie im Falle von MARV-GP durch die Überexpression des DN MyoVb Tail inhibiert werden kann. Dazu wurden die Oberflächenproteine gemeinsam mit DN MyoVb Tail und mCh-Rab11 in HuH7-Zellen exprimiert und die Zellen nach 24 h fixiert, permeabilisiert und gefärbt. Wie in Abb. 5.16 B abgebildet, zeigten alle viralen Oberflächenproteine eine Akkumulation in den perinukleären MyoVb Tail-Aggregaten. Während die Akkumulation im Falle von EBOV-GP, IAV-HA sowie NiV-G ähnlich stark ausgeprägt war wie beim MARV-GP (Abb. 5.16 B, rote Pfeile), zeigten NiV-F und VSV-G eine im Vergleich verminderte Assoziation mit MyoVb Tail. Insbesondere im Falle von NiV-F konnten häufig MyoVb Tail-Aggregate ohne oder nur mit einer sehr geringen Menge an NiV-F detektiert werden (Abb. 5.16 B, fünftes Panel, goldene Pfeilköpfe). Dieser schwächere Effekt von MyoVb Tail auf NiV-F und VSV-G könnte dadurch begründet sein, dass beide Proteine sehr effizient und schnell transportiert werden, sodass ein Teil dieser Proteine bereits die PM erreicht haben könnte, bevor der DN Phänotyp des MyoVb Tail in den Zellen etabliert war. Im nächsten Schritt sollte analysiert werden, ob die verschiedenen viralen Oberflächenproteine wie MARV-GP eine Assoziation mit MARV-VP40-reichen Membranclustern an der

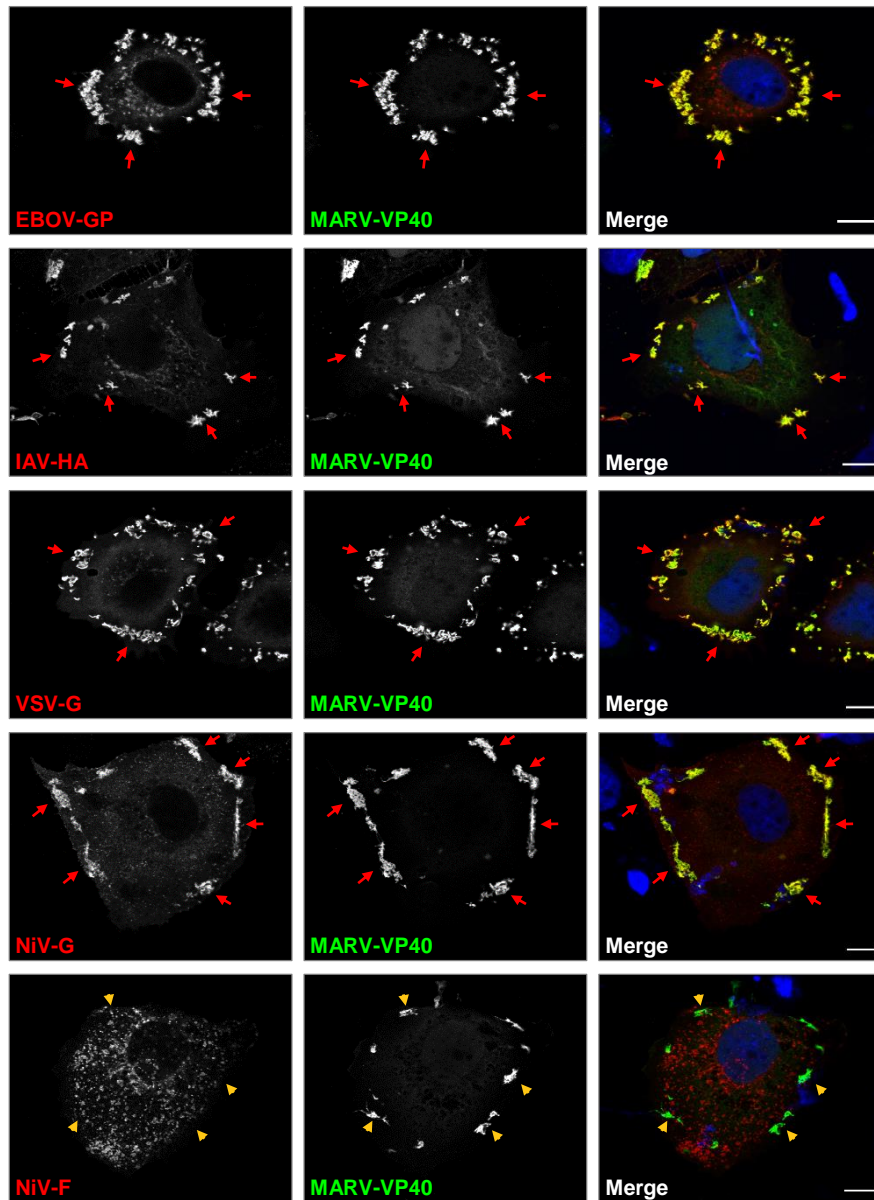
A



B



C



**Abb. 5.16:** Die meisten Oberflächenproteine von anderen RNA-Viren werden wie MARV-GP in perinukleäre MyoVb Tail-Aggregate und in periphere MARV-VP40-Cluster rekrutiert.

**(A)** Verteilung von verschiedenen viralen Oberflächenproteinen in HuH7-Zellen. Subkonfluente HuH7-Zellen wurden mit pCAGGS-EBOV-GP, -IAV-HA, -NiV-F-HA bzw. pHCMV-VSV-G transfiziert und 24 hpt fixiert und permeabilisiert. Die Färbung von EBOV-GP und VSV-G erfolgte mit spezifischen monoklonalen IgG aus der Maus, während IAV-HA mit einem spezifischen polyklonalen IgG-Serum und NiV-G bzw. NiV-F mit einem polyklonalen anti-HA-Tag IgG, jeweils aus dem Kaninchen markiert wurden. Als Sekundärantikörper dienten jeweils Alexa Fluor 594-gekoppelte IgG-Seren aus der Maus bzw. aus dem Kaninchen. Die Nuclei wurden mit DAPI gegengefärbt. **(B)** Analyse des Einflusses der DN MyoVb Tail-Mutante auf die Verteilung der viralen Oberflächenproteine. Subkonfluente HuH7-Zellen wurden mit pEGFP-MyoVb Tail, pmCherry-Rab11 sowie den in A) genannten Plasmiden für die viralen Oberflächenproteine transfiziert und 24 hpt für 48 h mit 4 % PFA fixiert und anschließend permeabilisiert. Die Färbung erfolgte wie in A) mit der Ausnahme, dass die Sekundärantikörper mit Alexa Fluor 647 gekoppelt waren. Rote Pfeile deuten auf Strukturen, die eine Akkumulation der viralen Proteine in MyoVb Tail-Aggregaten zeigen, während goldene Pfeile auf MyoVb Tail-Aggregate zeigen, die keine oder nur geringfügige Mengen an viralen Proteinen enthalten. Gestrichelte Linien skizzieren die Zellgrenzen. **(C)** Analyse der Assoziation der viralen Oberflächenproteine mit MARV-VP40. Subkonfluente HuH7-Zellen wurden mit pCAGGS-MARV-VP40 sowie den in A) genannten Plasmiden für die viralen Oberflächenproteine transfiziert und 24 hpt mit 4 % PFA fixiert und permeabilisiert. Die Färbung der viralen Oberflächenproteine erfolgte wie in A), während VP40 entweder mit einem polyklonalen IgG-Serum aus dem Kaninchen ( $\alpha$ -NC) oder einem monoklonalen IgG aus der Maus (40-2-2) markiert wurde. Als Sekundärantikörper für VP40 dienten jeweils Alexa Fluor 488-gekoppelte IgG-Seren aus der Maus bzw. aus dem Kaninchen. Rote Pfeile deuten auf Akkumulation der viralen Oberflächenproteine in den VP40-Clustern, goldene Pfeilköpfe zeigen negative VP40-Cluster. Maßstabsbalken = 10  $\mu$ m.

PM aufweisen. Dazu wurden die Oberflächenproteine gemeinsam mit VP40 in HuH7-Zellen exprimiert. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit spezifischen Antikörpern gefärbt. Betrachtet man nun die Verteilung bei Koexpression von MARV-VP40 zeigt sich, dass sowohl EBOV-GP, VSV-G, IAV-HA als auch NiV-G eine deutliche Akkumulation in den VP40-Clustern aufwiesen (Abb. 5.16 B, erstes bis viertes Panel, rote Pfeile), während das NiV-F hauptsächlich seine Lokalisation in den sphärischen Vesikeln beibehielt (Abb. 5.16 B, fünftes Panel, goldene Pfeilköpfe). Da für NiV-F eine sehr effiziente Re-Endozytose von der PM berichtet ist (Diederich et al., 2012), könnte ein schneller Abtransport des NiV-F von den Cluster-Strukturen dessen Akkumulation verhindert haben (eventuell trotz einer möglicherweise transienten Kolo-kalisation).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass alle hier untersuchten viralen Oberflächenproteine sowohl im Hinblick auf den Endpunkt des Transports (VP40-reiche Membrancluster) als auch im Hinblick auf Zwischenschritte bei diesem Transport (MyoVb-positives Kompartiment) bestimmte Gemeinsamkeiten aufweisen. Diese Beobachtungen sprechen einerseits dafür, dass das Myosin Vb-positive Recycling-System eine umfassendere Rolle im Transport und Assemblierungsprozess verschiedener Viren spielen könnte als bisher angenommen. Andererseits ist die Fähigkeit der verschiedenen Oberflächenproteine, mit MARV-VP40 zu assoziieren, ein Hinweis darauf, dass die Zusammenkunft von MARV-GP und MARV-VP40 an der PM eventuell keiner hochspezifischen Interaktion dieser beiden Proteine bedarf. Diese beiden Beobachtungen können daher interessante Ansatzpunkte für zukünftige Studien darstellen.

## 5.4 Zusammenfassung

Resümiert man die Ergebnisse dieser Arbeit, konnte im ersten Teil gezeigt werden, dass MARV-GP sowohl in transient transfizierten als auch in MARV-infizierten Zellen mit Markerproteinen des RE (TfR, GFP-Rab11) kolo-kalisiert. Ein Erreichen dieses Kompartiments über Re-Endozytose von der PM konnte ausgeschlossen werden, was für eine Rolle dieses Kompartiments im „biosynthetischen“ Transport zwischen dem Golgi-Apparat und der PM spricht. Im zweiten Teil konnte nachgewiesen werden, dass die im RE lokalisierte, kleine GTPase Rab11 keine essentielle funktionelle Bedeutung für den GP-Transport besitzt und daher wohl nur eine Ko-Präsenz mit GP aufweist oder eine supportive Rolle besitzt, die durch alternative Rab-GTPasen ersetzt werden kann. Die funktionelle Ablation des endosomalen Recycling-Systems infolge der Überexpression einer DN Mutante von Myosin Vb führte hingegen zu einer intrazellulären Akkumulation von MARV-GP und zog einen verminderten GP-Transport zur Oberfläche im Allgemeinen und zu VP40-reichen Clustern an der PM im Speziellen nach sich. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass dieser Transportschritt von wesentlicher Bedeutung für die Zusammenkunft von GP und VP40 an der PM und damit für eine korrekte



Assemblierung neuer MARV-Partikel ist. Insgesamt zeigen die hier beschriebenen Resultate eine bisher unbekannte Rolle des Myosin Vb-assoziierten Recycling-Systems für den intrazellulären Transport von MARV-GP.



## 6 Diskussion

Das MARV besitzt mit dem Glykoprotein GP ein einziges Oberflächenprotein mit essentiellen Funktionen für den viralen Replikationszyklus. Um infektiöse Partikel zu generieren, ist es daher von zentraler Bedeutung für das Virus, dass GP von dem Ort seiner Synthese am rER zu den viralen „*Budding-Sites*“ an der PM gelangt und anschließend in neue Viruspartikel inkorporiert wird. Obwohl seit langem bekannt ist, dass GP zunächst dem klassischen sekretorischen Pfad über das ER und den Golgi-Apparat folgt, ist der Kenntnisstand über dessen *post*-Golgi-Transport stark limitiert. Das Ziel dieser Arbeit war daher, den Transport von MARV-GP zwischen dem Golgi-Apparat und der PM näher zu charakterisieren und dabei mögliche Transit-Kompartimente und zelluläre Wirtsfaktoren zu identifizieren, die diesen Prozess vermitteln. Aufgrund vorläufiger Ergebnisse aus vorangegangenen Studien, sollte der Fokus dabei auf der Untersuchung einer potentiellen Rolle des endosomalen Recycling-Systems liegen.

### 6.1 Die Koloalisationsanalyse des Marburg Virus-Glykoproteins und zellulären Markerproteinen deutet auf einen Transit des Glykoproteins durch das endosomale Recycling-System

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der *post*-Golgi-Transport von MARV-GP zunächst anhand einer konfokalmikroskopischen Analyse der intrazellulären Verteilung von GP untersucht. Dabei sollte mithilfe einer vergleichenden Koloalisationsanalyse überprüft werden, ob die subzelluläre Lokalisation von GP Überlappungen mit bekannten endosomalen Markerproteinen aufweist. Um ein möglichst breites Spektrum an Markerproteinen abzudecken, wurden sowohl endogene Proteine mittels Antikörperfärbung angefärbt als auch GFP-gekoppelte Fusionsproteine von zellulären Rab-GTPasen verwendet. Bei der Analyse zeigt sich, dass MARV-GP sowohl in transient transfizierten als auch in MARV-infizierten Zelle eine ausgeprägte Koloalisation mit Markerproteinen des RE (TfR, GFP-Rab11) aufwies (5.1.1 + 5.1.3). Die Überlagerung war nicht vollständig, aber deutlich stärker verglichen mit frühen (EEA1, GFP-Rab5) und späten Endosomen (LAMP1, LAMP2, GFP-Rab9), was für eine zumindest partielle Lokalisation von MARV-GP im endosomalen Recycling-System spricht. Der TfR wurde hier als Marker für RE verwendet, pendelt in der Realität jedoch zwischen der PM, frühen und Recycling Endosomen (Sheff et al., 1999; Mayle et al., 2012). Dennoch konnte nur eine sehr geringe Koloalisation von GP und den frühendosomalen Markern EEA1 und GFP-Rab5 beobachtet werden, während die Überlagerung mit dem RE-Marker GFP-Rab11 ähnlich ausgeprägt war wie mit dem TfR. Tatsächlich legt eine Studie von Kobayashi und Fukuda nahe, dass der TfR präferentiell im RE und nur geringfügig in frühen Endosomen lokalisiert ist (Kobayashi und Fukuda, 2013). Die Ergebnisse stützen



daher eine Kolokalisation von MARV-GP und dem TfR im RE. Interessanterweise spricht die o.g. Studie für die Existenz verschiedener Subpopulationen von RE, die von dem TfR, Rab11 bzw. ARF6 definiert werden. Darüber hinaus konnten bspw. Rab8-assoziierte, aber Rab11-negative Elemente innerhalb des Recycling-Systems identifiziert werden (Roland et al., 2007). Diese dem Recycling-System inhärente Dynamik und Heterogenität deutet darauf hin, dass die hier durchgeführte mikroskopische Analyse möglicherweise nur einen Teil der tatsächlichen Verknüpfung von MARV-GP mit diesem Kompartiment abbildet.

Auch wenn die Kolokalisationsanalyse erste Hinweise auf die Lokalisation und Transportwege von MARV-GP gibt, ist deren Aussagekraft im Hinblick auf die tatsächliche biologische Bedeutung limitiert. Dies ist einerseits technisch bedingt, da die maximal erreichbare Auflösung eines konfokalen Mikroskops selbst unter Annahme optimaler Bedingungen lateral ca. 132 nm und axial ca. 344 nm beträgt (berechnet anhand der Halbwertsbreite der „*Point Spread Function*“ bei einer Wellenlänge von 500 nm und einer numerischen Apertur von 1.4, McConnell et al., 2011), was nur unwesentlich unterhalb der Größe von Endosomen liegt (von Wangenheim et al., 2016). Daher ist es nicht auszuschließen, dass zwei in der Realität unterschiedliche Strukturen nicht aufgelöst werden können und damit als ein Objekt erscheinen. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass, selbst wenn die untersuchten Proteine in denselben zellulären Strukturen (ko-)lokalisieren, sie nicht miteinander interagieren bzw. funktionell nicht voneinander abhängen. Auch eine nur transiente oder von bestimmten raumzeitlichen Bedingungen abhängigen Kolokalisation ist denkbar. Gerade mit Blick auf das hier im Fokus stehende RE zeigt sich dies deutlich im Falle der beiden kleinen GTPasen Rab8 und Rab11. Auf der einen Seite kolokalisieren beide Proteine in kleinen Vesikeln, interagieren mit den gleichen Effektoren (Myosin Vb, Rabin8) und konnten gar als Teil einer Rab8-Rab11-regulierten Aktivierungskaskade bei der Ziliogenese identifiziert werden (Hattula et al., 2006; Roland et al., 2011; Knödler et al., 2010). Auf der anderen Seite wird in denselben Studien gezeigt, dass Rab8-positive tubuläre Strukturen existieren, die kein Rab11 enthalten, und auch im Komplex mit Myosin Vb regulieren beide Proteine teilweise distinkte Transportwege (Roland et al., 2007; 2011). Eine korrekte Einordnung und Interpretation dieser Ergebnisse hängt daher von weiteren funktionellen Studien ab, auf die im weiteren Verlauf dieses Kapitels noch eingegangen wird.

Eine weitere Auffälligkeit bei der Analyse der GP-Verteilung war, dass vor allem in transfizierten Zellen verschiedene Populationen von GP-haltigen Vesikeln auftraten. Regelmäßig zu beobachten waren dabei in Relation zu der Mehrzahl an GP-positiven Strukturen deutlich vergrößerte Vesikel mit einer klaren sphärischen Morphologie (Abb. 5.1). Diese zeigten keine Kolokalisation mit GFP-Rab11, sondern waren oft von einem zirkulären GFP-Rab9-Signal umschlossen. Weiterhin konnte bei diesen Vesikeln häufig eine Assoziation mit LAMP1 oder LAMP2 beobachtet werden und auch Versuche mit einem

GFP-gekoppelten Rab7 deuten auf einen spätendosomal bzw. lysosomalen Charakter dieser Vesikel (Luzio et al., 2007; Bandyopadhyay et al., 2014). Dass diese Strukturen deutlich seltener in MARV-infizierten Zellen beobachtet wurden, könnte damit zusammenhängen, dass während einer Infektion die Expression der Proteine durch den mRNA-Gradienten bei der viralen Transkription (Mühlberger et al., 2007) deutlich regulierter verläuft als bei einer Plasmid-basierten Überexpression und darüber hinaus die viralen Proteine ständig in neue Partikel inkorporiert werden, die die Zelle verlassen. Daher könnte es sich bei diesen Strukturen um späte Endosomen bzw. Lysosomen handeln, in denen überschüssiges GP degradiert wird. Zur Aufklärung, ob es sich bei diesen Vesikeln um ein degradatives oder doch ein Transportkompartiment handelt, könnte in zukünftigen Experimenten z.B. der Einfluss von Inhibitoren des lysosomalen Abbaus wie Chloroquin oder Leupeptin (Beispiel in Qin et al., 2003) auf die Expression und Verteilung von GP untersucht werden.

Die Ausgangsthese dieser Arbeit war, dass der *post*-Golgi-Transport von MARV-GP mit dem endosomal Recycling-System verknüpft ist. Die Daten der Kollokalisationsanalyse scheinen diese These zu stützen. Da es sich bei dem Recycling-System allerdings um ein intermediäres Kompartiment handelt, in dem biosynthetische und endozytotische Transportrouten zusammenlaufen (Ang et al., 2004; Ellis et al., 2006; Taguchi, 2013; Goldenring, 2015), lassen diese statischen Aufnahmen der Lokalisation keine Aussage darüber zu, über welchen Weg das GP in dieses Kompartiment gelangt. Für einige virale Proteine wie dem F-Protein des NiV oder dem *env*-Protein des HIV-1 ist gezeigt, dass sie nach dem primären Erreichen der PM mittels Endozytose re-internalisiert werden und erst anschließend RE passieren (Diederich et al., 2012; Weis und Maisner, 2015; Kirschman et al., 2018). Mithilfe eines Antikörper-Aufnahme Assays wurde daher untersucht, ob MARV-GP ebenfalls eine Re-Endozytose zeigt und eventuell über diesen Schritt das RE erreicht (Abb. 5.2). Während für das Kontrollprotein NiV-F die zuvor berichtete effiziente Endozytose bestätigt wurde, konnte kein internalisiertes MARV-GP detektiert werden. Parallel zu ähnlich aufgebauten Experimenten (Vogt et al., 2005; Diederich et al., 2012) sah das Protokoll einen Internalisierungszeitraum von 30 min vor, wodurch nicht ausgeschlossen werden kann, dass ein kleiner Teil des GP über einen längeren Zeitraum hinweg doch re-endozytiert wird. Allerdings konnte bei Vogt und Kollegen neben der effizienten, Signal-basierten Endozytose des NiV-F auch das deutlich langsamer, über eine kontinuierlich ablaufende „*bulk*-“ Endozytose internalisierte NiV-G nach 30 min bereits im Inneren der Zelle nachgewiesen werden (Vogt et al., 2005). Im Gegensatz dazu zeigt MARV-GP innerhalb dieses Zeitraums überhaupt keine Endozytose-Aktivität, was einen Transport in das Recycling-System über eine Re-Endozytose sehr unwahrscheinlich erscheinen lässt. Eine solche Exklusion von jeglicher Endozytose ist bereits für das HA des IAV gezeigt, das in seiner TMD Informationen für die Retention an der PM besitzt (Lazarovits et al., 1996). Vor dem Hintergrund, dass sowohl im Falle von MARV-GP

als auch von IAV-HA die TMD jeweils eine wichtige Rolle für den korrekten intrazellulären Transport spielt und zudem beide Proteine apikal sortierte Typ I-Transmembranproteine darstellen (Lin et al., 1998; Sänger et al., 2001; Mittler et al., 2007), ist denkbar, dass beide Proteine eine ähnliche Strategie zur Verhinderung einer Re-Endozytose entwickelt haben. Parallel zu der o.g. Studie von Lazarovits und Kollegen könnte die Generation von GP-Chimären mit verschiedenen TMD und/oder CD von fremden Proteinen mit bekannter Endozytose-Aktivität eine nähere Analyse dieser Mechanismen ermöglichen.

Insgesamt können die Kolokalisationsanalysen von MARV-GP und endosomalen Markerproteinen als erster Hinweis auf eine tatsächliche Lokalisation von GP im endosomalen Recycling-System gewertet werden. Darüber hinaus konnte ausgeschlossen werden, dass MARV-GP über eine Re-Endozytose in dieses Kompartiment gelangt.

## 6.2 Die funktionelle Ablation des Myosin Vb-assoziierten endosomalen Recycling-Systems inhibiert den Oberflächentransport des Marburg Virus-Glykoproteins

Um zu überprüfen, ob tatsächlich ein Transit von MARV-GP durch das endosomale Recycling-System stattfindet, wurde dieses Kompartiment mithilfe einer Überexpression der DN wirkenden „Tail“-Mutante von Myosin Vb funktionell blockiert. Beim Myosin Vb handelt es sich um ein Aktin-basiertes Motorprotein und einen Schlüsselfaktor des endosomalen Recycling-Systems, das in polarisierten Zellen im ARE lokalisiert ist (Lapierre et al., 2001). Myosin Vb besitzt eine bedeutende Rolle bei dem Transport, insbesondere apikal sortierter Proteine, zur PM und operiert, ähnlich wie sein Paralog Myosin Va, vermutlich hauptsächlich an kortikalen Aktin/Tubulin-Konnexionspunkten, wo es Tubulin-abhängige Vesikel am Aktin-Kortex arretiert, um letztlich den Weitertransport zur PM zu vermitteln (Lapierre et al., 2001; Desnos et al., 2007; Wang et al., 2008; Provance et al., 2008; Kapitein et al., 2013). Aufgrund der zentralen Rolle von Myosin Vb im RE ist die Überexpression des DN MyoVb Tail daher eine häufig genutzte Technik zur Überprüfung eines Transports durch das Recycling-System / ARE (s. Lapierre et al., 2005: *„Expression of myosin Vb tail represents a powerful provocative test for the trafficking of cargoes through Rab11-containing plasma membrane recycling systems.“*). Beispiele für zelluläre Proteine, deren Transport über RE mithilfe der MyoVb Tail-Mutante untersucht wurden, sind u.a. der TfR, *de novo* synthetisiertes gp135, das zelluläre Glykoprotein MUC1 (Lapierre et al., 2001; Mattila et al., 2009; Stoops et al., 2016) und im virologischen Kontext die Freisetzung des RSV sowie der Transport von Nukleokapsiden des hPIV1 und des SeV bzw. des vpu-Proteins von HIV-1 (Brock et al., 2003; Varthakavi et al., 2006; Stone et al., 2016).

In der vorliegenden Arbeit führte die Überexpression von MyoVb Tail zu einer aberranten Verteilung von MARV-GP in der IFA, das gemeinsam mit MyoVb Tail-positiven Aggregationen in der perinukleären Region akkumulierte und dabei eine verminderte periphere Lokalisation aufwies (5.2.3). Mithilfe von quantitativen Analysen der GP-Oberflächenexpression (IFA und OBA) konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von MyoVb Tail eine signifikante Verringerung der Oberflächenlevel von GP nach sich zog (5.2.5 + 5.2.6). Dabei waren diese Effekte spezifisch für das MyoVb Tail, da die DN Tail-Mutante des vor allem in sekretorischen Granula lokalisierten Myosin Vc (Rodriguez und Cheney, 2002) keinen Einfluss auf die Verteilung und die Oberflächenexpression von MARV-GP hatte. Das ebenfalls getestete DN MyoVa Tail führte zwar ebenfalls zu einer partiellen perinukleären Akkumulation von GP, jedoch konnte in den quantitativen Analysen kein Effekt auf die Oberflächenexpression festgestellt werden. Dies könnte mit der im Vergleich zu MyoVb und MyoVc Tail schwächeren Expression von MyoVa Tail zusammenhängen, sodass ein Zusammenhang von Myosin Va und dem GP-Transport nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann.

Der Mechanismus des DN Phänotyps der Tail-Mutanten der Myosin V-Familie basiert auf einer deletierten Motordomäne, wodurch diese Proteine ihren spezifischen Cargo nur noch binden, aber nicht mehr über das Zytoskelett transportieren können (Hammer und Sellers, 2012). In der Folge bilden sich die oben beschriebenen perinukleären Aggregate, die als kollabierte Membranzisternen, bestehend aus den funktionell defekten Myosinen sowie ihrem Cargo, beschrieben worden sind (Roland et al., 2011). Im Einklang mit diesen Beschreibungen konnte in der vorliegenden Arbeit anhand der Färbung von verschiedenen zellulären Markerproteinen bestätigt werden, dass ausschließlich Proteine aus dem RE und keine Golgi-assoziierten oder früh- bzw. spätendosomalen Faktoren in den MyoVb Tail-Aggregaten eingeschlossen werden (5.2.4). Vor diesem Hintergrund ist die Beobachtung, dass die Expression des DN MyoVb eine so deutliche Umverteilung von MARV-GP zu den perinukleären Aggregaten bei einer gleichzeitigen Inhibition des Oberflächentransports bewirkt, nur dadurch zu erklären, dass der Transport von MARV-GP zur Zelloberfläche durch das Myosin Vb-positive Recycling-System verläuft. Im Gegensatz zu MARV-GP hatte die Expression des MyoVb Tail weder einen Effekt auf die Verteilung von MARV-NP noch von MARV-VP40, was im Einklang steht mit der bisherigen Annahme, dass die Transportwege von GP, VP40 und Nukleokapsiden im Wesentlichen separiert voneinander verlaufen (Schudt et al., 2013; Kolesnikova et al., 2017).

### 6.3 Zelluläre Transportregulatoren des endosomalen Recycling-Systems im Zusammenspiel mit dem Marburg Virus-Glykoprotein

#### 6.3.1 Die Rolle des Motorproteins Myosin Vb für den Transport des Marburg Virus Glykoproteins

Anhand der funktionellen Ablation des Myosin Vb-assoziierten Recycling-Systems konnte gezeigt werden, dass MARV-GP durch dieses Kompartiment zur Zelloberfläche transportiert wird. Neben dieser generellen Aussage stellt sich allerdings die Frage, welche zellulären Transportregulatoren auf Proteinebene den GP-Transport in diesem Kompartiment vermitteln. Zwar konnte gezeigt werden, dass das DN MyoVb Tail den Transport von GP am RE hemmt, jedoch werden weitere Versuche benötigt, um eine direkte Rolle des funktionellen Myosin Vb nachzuweisen. Um den direkten Ko-Transport von MARV-GP und Myosin Vb zu visualisieren, sollten zukünftig Lebendzell-mikroskopische Experimente mit einer humanen Variante des Myosin Vb durchgeführt werden. In diesem Fall könnte zudem mithilfe der TIRF- („*total internal reflection fluorescence*“) Mikroskopie, die selektiv die Visualisierung der PM sowie PM-naher Bereiche zulässt (Fish, 2009), das Zusammenspiel von Myosin Vb und GP-haltigen Vesikeln bei der Beförderung zur PM näher untersucht werden. Komplettiert werden sollten diese Experimente mit einer Depletion (sowie einem anschließenden „*Rescue*“) des endogenen Myosin Vb, um eine direkte Funktion beim Transport von MARV-GP nachzuweisen.

#### 6.3.2 Die Rolle der kleinen GTPase Rab11 für den Transport des Marburg Virus Glykoproteins

Rab-GTPasen („*Ras-related proteins in brain*“) stellen eine evolutionär konservierte Familie monomerer G-Proteine in der Ras-Superfamilie dar. Sie sind in der Zelle abhängig von ihren Effektoren an spezifischen Membranen lokalisiert und zirkulieren zwischen subzellulären Kompartimenten, wobei sie zwischen einer inaktiven GDP- und einer aktiven GTP-gebundenen Form interkonvertieren und dabei als eine Art molekularer Schalter zelluläre Transportprozesse koordinieren (Pfeffer und Aivazian, 2004; Stenmark, 2009; Bhuiin und Roy, 2014). Das ubiquitär exprimierte Rab11 ist vor allem im endosomalen Recycling System (in polarisierten Zellen im ARE) lokalisiert und steuert den Transport von endozytotischem, aber auch sekretorischem Cargo durch das RE zur PM (Urbé et al., 1993; Ullrich et al., 1996; Welz et al., 2014). Ein wichtiges Effektorprotein ist dabei das Aktin-assoziierte Motorprotein Myosin Vb, dessen Motorfunktion primär durch Rab11 gesteuert wird (Roland et al., 2011; Schäfer et al., 2014; Ji et al., 2019). Rab11-vermittelte Transportrouten werden von verschiedensten Cargomolekülen genutzt, darunter u.a. die zellulären Proteine E-Cadherin, TfR, Rhodopsin und das Sialomuzin Endolyn (Ullrich et al., 1996; Cresawn et al., 2007; Desclozeaux et al.,

2008; Thuenauer, 2014) sowie virale Komponenten wie die RNP-Komplexe des IAV oder das NiV-F (Momose et al., 2011; Diederich et al., 2012). Zudem gibt es Berichte, dass verschiedene apikale Transportrouten generell über Rab11-positive Endosomen verlaufen (Cramm-Behrens et al., 2008).

Da MARV-GP in konfokalmikroskopischen Aufnahmen eine ausgeprägte Kolokalisation mit Rab11 zeigte, wurde untersucht, ob dieser zelluläre Transportregulator auch eine funktionelle Rolle für die Beförderung von GP besitzt. Zunächst wurde mittels Lebendzellmikroskopie analysiert, ob ein Ko-Transport von GP- und Rab11-haltigen Vesikeln beobachtet werden kann. Diese Technik bildet im Gegensatz zu fixierten Zellen wie in der Kolokalisationsanalyse die ganze Dynamik lebender Zellen ab und wurde bspw. erfolgreich für die Untersuchung des gemeinsamen Transports von IAV-Nukleokapsiden und Rab11 oder MARV-Nukleokapsiden und Myosin10 verwendet (Amorim et al., 2011; Schudt et al., 2013). In dieser Arbeit konnte zwar ein Ko-Transport eines mCherry-gekoppelten MARV-GP und GFP-Rab11 beobachtet werden (Abb. 5.6), was zeigt, dass GP und Rab11 nicht nur kolokalisieren, sondern tatsächlich auch in denselben Strukturen längere Strecken in der Zelle zurücklegen können. Allerdings war dieses Ereignis eher selten zu beobachten und der Großteil der GP- und Rab11-Vesikel bewegten sich separiert voneinander.

Wie ist diese Diskrepanz zu den den Kolokalisationsanalysen in 5.1.1 und 5.1.3 zu erklären? Ein bedeutender Unterschied zwischen beiden diesen Experimenten war der technische Hintergrund, denn während für die Kolokalisationsanalyse ein konfokales Laser-Scanning Mikroskop verwendet wurde, stand für die Lebendzellaufnahmen nur ein Weitfeld-Mikroskop zur Verfügung, das im Vergleich ein deutlich schlechteres Auflösungsvermögen zeigt. Dadurch konnten zwar starke Fluoreszenzsignale, die im Falle des GP vor allem im perinukleären Bereich und in großen, sphärischen Vesikeln auftraten, gut detektiert werden, aber gerade kleinere, punktförmige Strukturen konnten oft nur schwer aufgelöst werden. Wie in 6.1 diskutiert, waren es aber gerade diese kleineren Strukturen und nicht die großen, sphärischen Vesikel, die in konfokalen Aufnahmen eine Kolokalisation mit Rab11 zeigten. Es könnte also durchaus sein, dass die häufigere Beobachtung des GP/Rab11-Ko-Transports durch technische Limitierungen verhindert wurde. In Zukunft sollte daher zur Untersuchung des Ko-Transports von GP und zellulären Regulatoren ein konfokales Lebendzellmikroskop verwendet werden. Eine weitere mögliche Erklärung für die geringe Assoziation in der Lebendzellmikroskopie könnte mit der Proteinstruktur des mCherry-gekoppelten GP zusammenhängen. Im Gegensatz zu der Kolokalisationsanalyse, in der ein unverändertes MARV-GP mittels indirekter Antikörperfärbung detektiert wurde, musste in der Lebendzellmikroskopie auf ein rekombinantes, autofluoreszierendes GP zurückgegriffen werden, dessen MLD durch das Fluorophor mCherry ersetzt wurde. Zwar konnte gezeigt werden, dass diese Substitution keinen Einfluss auf die Fähigkeit des GP hat, zur Oberfläche zu gelangen und in neue Partikel inkorporiert zu werden (Mittler, Schudt, Halwe et al., 2018), doch ist

nicht klar, ob die MLD eventuell doch auf subzellulärer Ebene die Vesikel determiniert, die für diesen Transport zur Oberfläche genutzt werden. In der MLD ist der überwiegende Teil der O-Glykane sowie ungefähr die Hälfte der N-Glykane von MARV-GP konzentriert und sowohl O- als auch N-Glykane sind bekannte Transportsignale für apikal sortierte Proteine, zu denen auch MARV-GP zählt (Sänger et al., 2001; Potter et al., 2006). In der Literatur finden sich für beide dieser Glykosylierungsmuster Beispiele, in denen eine Aberration die apikale Lokalisation, aber nicht den Oberflächentransport an sich blockierte. So führte die Trunkierung der O-glykosylierten „Stalk“-Domänen des apikalen p75 Neurotrophin-Rezeptors oder des Bürstensaumenzym Sucrase-Isomaltase (SI) ebenso zu einem fehlerhaften Transport zur basolateralen Membran wie die Mutation zweier spezifischer N-Glykosylierungsstellen des membranverankerten Endolyn (Yeaman et al., 1997; Jacob et al., 2000; Potter et al., 2004). Im Falle des Endolyns resultierte diese Fehlsortierung aus einem zusätzlichen, schwächeren basolateralen Transportsignal in der CD, das infolge der Deletion der N-Glykane zum primären Transportsignal wurde (Ihlke et al., 2001; Potter et al., 2004). Auch die SI besitzt ein zweites Sortierungssignal in der TMD, das ebenso wie die O-Glykane für den korrekten Transport erforderlich ist (Jacob et al., 2000). Es ist nicht bekannt, welche Rolle die N- und O-Glykane für die Sortierung von MARV-GP spielen, jedoch besitzt das GP mit der TMD mindestens ein weiteres Sortierungssignal (Mittler et al., 2007). Welche Rolle im Detail den N- und O-Glykanen insgesamt und der MLD im Besonderen für die Sortierung und subzelluläre Lokalisation des MARV-GP zukommt, bleibt in weiteren Studien aufzuklären. Bis diese Fragen eindeutig geklärt sind, wäre für die Untersuchung der intrazellulären Transportrouten von MARV-GP mittels Lebendzellmikroskopie die Verwendung eines autofluoreszierenden GP inklusive der MLD eine alternative Lösung mit höherer Aussagekraft.

Um eine belastbare Aussage über die funktionelle Bedeutung von Rab11 für den Transport von MARV-GP zu treffen, wurde daher zusätzlich untersucht, welchen Einfluss die Überexpression von DN bzw. KA Rab11-Mutanten oder eine siRNA-vermittelte Depletion von Rab11 auf die Verteilung und die Oberflächenexpression des GP besitzt (5.2.2). Im Falle der DN/KA Rab11-Mutanten konnte zwar eine Kolo-kalisation von GP und den Rab11-Mutanten beobachtet werden, jedoch war die GP-Verteilung nicht erheblich verändert. Dies könnte daran gelegen haben, dass die Effekte aufgrund des noch immer präsenten endogenen Rab11 zu gering waren, als dass sie bei reiner Betrachtung der Verteilung im Mikroskop aufgefallen wären. Auch stellen neuere Erkenntnisse die molekularen Mechanismen dieser Mutanten im Zusammenspiel mit ihren jeweiligen Effektoren infrage, sodass die Ergebnisse mit diesen Mutanten nur mit Vorsicht interpretiert werden sollten (Langemeyer et al., 2014; kommentiert von Nottingham und Pfeffer, 2014). Andererseits finden sich besonders für die Rab11-Mutanten eine Vielzahl an Studien, die einen Effekt auf das Zielprotein nachweisen konnten (Beispiele in Ullrich et al., 1996; Ren et al., 1998; Cramm-Behrens et al., 2008). Diese Ergebnisse sollten daher durch eine siRNA-vermittelte Depletion des endogenen Rab11 bestätigt werden. Hier zeigte sich, dass sich auch die



Rab11-Depletion weder auf die Verteilung des GP in der IFA noch auf die Oberflächenlevel im OBA auswirkte. Dies spricht dafür, dass Rab11 keine essentielle funktionelle Bedeutung für den Transport von GP besitzt, sondern entweder nur eine Ko-Präsenz von Rab11 und GP in denselben Strukturen vorliegt (s. 5.1) oder Rab11 eine supportive Rolle zukommt, die im Falle einer Depletion von einer alternativen Rab-GTPase übernommen werden kann. Dies wirft die Frage auf, welche zellulären Faktoren dann an der Vermittlung des Transports von GP beteiligt sind. Im endosomalen Recycling-System sind noch eine Reihe weiterer Rab-GTPasen beschrieben, die in diesem Kompartiment Transportprozesse steuern. Die Rab11-Familie besteht bspw. aus insgesamt drei Vertretern, Rab11A, Rab11B und Rab25/Rab11C (in der Folge nur noch Rab25 genannt), die allesamt nicht nur mit dem endosomalen Recycling-System assoziiert sind, sondern auch direkt mit Myosin Vb interagieren (Ullrich et al., 1996; Casanova et al., 1999; Schlierf et al., 2000; Lapierre et al., 2001). Während Rab11B ebenfalls infolge der siRNA-Behandlung herunterreguliert wurde (Abb. 5.8 B), ist nicht bekannt, welche Auswirkungen diese auf Rab25 hatte. Vor allem vor dem Hintergrund der nachgewiesenen direkten Interaktion mit Myosin Vb ist es theoretisch denkbar, dass Rab25 und nicht Rab11A bzw. Rab11B den GP-Transport reguliert oder dass Rab25 die Funktionen des depletierten Rab11A und Rab11B kompensiert.

Weiterhin muss bedacht werden, dass bestimmten zellulären Faktoren in polarisierten und unpolarisierten Zellen teilweise unterschiedliche Funktionen zugewiesen sind. So besitzt Rab11 bspw. eine zentrale Bedeutung für den Transport von MeV- und MuV-Nukleokapsiden zur apikalen Membran in polarisierten Zellen, ist jedoch in unpolarisierten Zellen absolut entbehrlich für die Beförderung der Nukleokapside zur PM (Nakatsu et al., 2013). Auch im Falle des MARV-GP-Transports ist es möglich, dass Rab11 in den hier verwendeten unpolarisierten Zellen keine essentielle Funktion besitzt, aber für den apikalen Transport in polarisierten Zellen, eventuell im Zusammenspiel mit Myosin Vb, hingegen benötigt wird.

### **6.3.3 Alternative Rab-GTPasen im endosomalen Recycling-System mit einer möglichen Funktion für den Transport des Marburg Virus Glykoproteins**

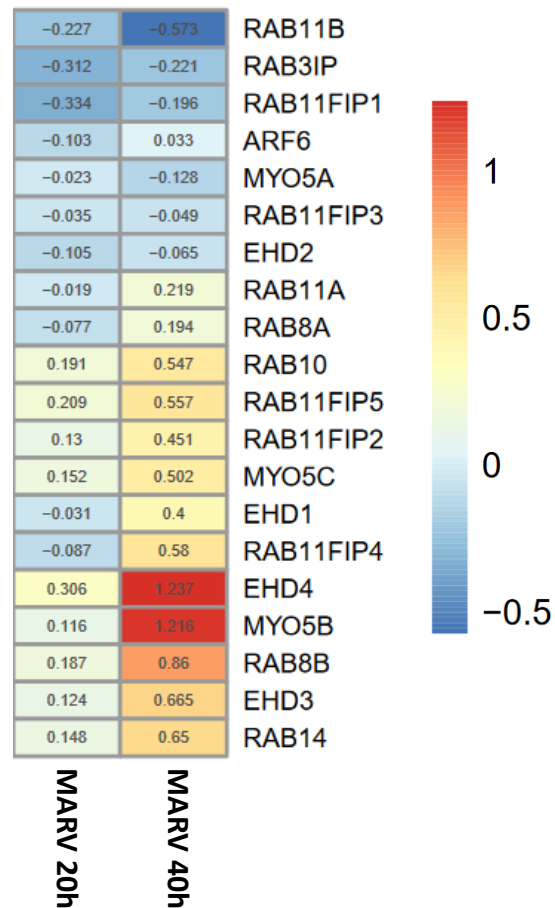
Welche anderen Rab-GTPasen sind im endosomalen Recycling-System lokalisiert und könnten möglicherweise anstelle von Rab11 die Regulation des GP-Transports über dieses Kompartiment vermitteln? Ein alternativer Kandidat wäre gewiss das Rab8, das wie Rab11 ebenfalls mit Myosin Vb interagiert (Roland et al., 2007). Für Rab8 wurde bereits gezeigt, dass es partiell mit Rab11 in den gleichen Strukturen im endosomalen Recycling-System kolokalisiert, teilweise aber auch in Rab11-negativen Regionen zu finden ist (Hattula et al., 2006; Roland et al., 2007; 2011). Diese Strukturen weisen häufig eine eher tubuläre Morphologie auf und beherbergen weitere zelluläre Transportregulatoren wie EHD1 oder ARF6 (Roland et al., 2007). Im Hinblick auf polarisierte Zellen sind

sowohl Studien zu finden, die Rab8 mit dem Transport zur basolateralen Membran in Verbindung bringen (Huber et al., 1993; Ang et al., 2003; Henry und Sheff, 2008), als auch Studien, die eine Beteiligung von Rab8 beim apikalen Transport zeigen (Sato et al., 2007; 2014; Vogel et al., 2017). Für eine Beteiligung von Rab8 spricht, dass GP und GFP-gekoppeltes Rab8 eine zumindest partielle Kollokalisierung zeigen (Halwe, 2014), GFP-Rab8 auch in den durch MARV-VP40-induzierten Clustern an der PM akkumuliert (Abb. 5.3) und dass Rab8 eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von zellulären Protrusionen zukommt, an denen das MARV letztendlich freigesetzt wird (Hattula et al., 2006; Kolesnikova et al., 2007b). Gegen eine Beteiligung von Rab8 spricht, dass parallel zu Rab11 kein starker Effekt der DN und KA Rab8-Mutanten auf die GP-Verteilung beobachtet werden konnte (Halwe, 2014). Roland und Kollegen haben darüber hinaus postuliert, dass Rab8 zwar eine wichtige Funktion in Kombination mit Myosin Vb ausübt, der wichtigste Regulator von Myosin Vb aber das Rab11 ist (Roland et al., 2011). Einen besseren Einblick in die Funktion von Rab8 für den Transport von MARV-GP sollte eine siRNA-vermittelte Depletion von Rab8 sowie auch eine kombinierte Depletion von Rab8 und Rab11 liefern können. Eine andere Möglichkeit, um das Zusammenspiel von Myosin Vb, Rab8 bzw. Rab11 und MARV-GP eingehender zu untersuchen, wäre die Verwendung von MyoVb Tail-Mutanten, die durch die Einführung von Punktmutationen nur noch mit Rab8 oder Rab11 interagieren können (Roland et al., 2011). In der genannten Publikation verlor die Rab8-bindungsdefiziente MyoVb Tail-Mutante ihre Fähigkeit, mit dem Tfn-Recycling zu interferieren, woraus die Autoren schlossen, dass das Tfn-Recycling durch Rab11 und nicht durch Rab8 gesteuert wird. Parallel könnte man so untersuchen, ob eine der MyoVb Tail-Bindungsmutanten nicht mehr in der Lage ist, den Transport von MARV-GP zu blockieren. Rab8 besteht zudem aus zwei Isoformen, Rab8A und Rab8B, wobei über das letztere weniger bekannt ist (Armstrong et al., 1996). Rab8B scheint ebenso wie Rab8A an der Regulation des apikalen Transports beteiligt zu sein (Sato et al., 2014). Allerdings zeigt Rab8B im Gegensatz zu Rab8A keine Interaktion mit Myosin Vb (Roland et al., 2007).

Eine weitere Rab-GTPase, die eine Rolle im biosynthetischen und Recycling-Transport von apikalen Proteinen besitzt, ist das Rab14 (Junutula et al., 2004; Kitt et al., 2008). Es ist nicht bekannt, ob Rab14 mit Myosin Vb interagiert, allerdings wurde bereits eine Interaktion mit Myosin Va sowie bekannten Rab11-Effektoren der Klasse I Rab11-FIP-Familie gezeigt, was dafür spricht, dass Rab11 und Rab14 sehr ähnliche Bereiche des intrazellulären Transports steuern (Kelly et al., 2009; Lindsay et al., 2013). Für Rab14 wurde zudem eine substanzielle Funktion im Transport des *env*-Proteins von HIV-1 nachgewiesen (Qi et al., 2008; Kirschman et al., 2018), sodass Rab14 als interessanter Kandidat auch für den Transport von MARV-GP erscheint. Darüber hinaus sind mit Rab10 und Rab13 zwei weitere RE-assoziierte Rab-GTPasen zu nennen, die ebenfalls eine Akkumulation in den VP40-Clustern zeigten (Abb.). Rab10 ist vor allem im Hinblick auf den Transport von GLUT4-Vesikeln zur PM beschrieben und

kann ebenfalls direkt mit Myosin Vb interagieren (Roland et al., 2009), während das Rab13 in polarisierten Zellen den Transport vom TGN zum RE reguliert (Nokes et al., 2008).

Im Zuge der Infektion nehmen viele Viren über bisher meist noch nicht im Detail verstandene Mechanismen Einfluss auf die Expression von Wirtszellgenen, um z.B. die Produktion proviraler Faktoren zu fördern und die antiviraler Proteine zu reduzieren. Aufgrund der Bedeutung dieser differentiellen Regulation des Wirtszellproteoms durch Viren sind in den letzten Jahren einige Studien durchgeführt worden, um die virale Regulation von Wirtszellgenen durch eine Hochdurchsatz-Transkriptom-Analyse (RNA-Seq) näher zu untersuchen (Wang et al., 2014; Park et al., 2015; Hölzer et al., 2016). In einer unserer bisher unveröffentlichten Studien wurde dabei der Fokus auf Veränderungen im Wirtstranskriptom von humanen primären proximalen Tubuluszellen (PTC) in Folge einer MARV-Infektion gelegt (*Referenz: Dr. Benjamin Koch, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main*). Da eine Hochregulation von bestimmten Genen ein Indiz dafür sein kann, dass das Virus das entsprechende Genprodukt für bestimmte Schritte in seinem Replikationszyklus benötigt, wurde die Datenbank aus der Transkriptom-Analyse in MARV-infizierten PTC nach Transportregulatoren durchsucht, die eine mögliche Funktion beim Transport von MARV-GP durch das endosomale Recycling-System haben könnten. In Abb. 6.1 sind einige dieser vorläufigen Ergebnisse dargestellt. Tatsächlich weisen einige der hier diskutierten Proteine erhöhte mRNA-Level auf, insbesondere 40 h nach Infektion mit dem MARV. So zeigt bspw. das Myosin Vb mehr als doppelt so hohe mRNA-Level 40 h nach Infektion im Vergleich zu uninfizierten Kontrollzellen, während bspw. das Myosin Va nicht hochreguliert ist. Dieser Effekt für Myosin Vb korreliert sehr gut mit der in dieser Arbeit gezeigten Rolle des Myosin Vb-assoziierten Recycling-Systems für den Transport von MARV-GP und ist ein Indiz für eine mögliche direkte Funktion von Myosin Vb. Mit Blick auf die weiteren Faktoren fällt auf, dass Rab8A und Rab11A, die beiden am besten beschriebenen Interaktionspartner von Myosin Vb, kaum eine Veränderung aufweisen. Die zweite Isoform von Rab8, das Rab8B, erfährt hingegen fast eine Verdopplung der mRNA-Transkripte. Auch wenn Rab8B nicht mit Myosin Vb interagiert (Roland et al., 2007), stellt es sicherlich einen interessanten Kandidaten dar, der in der Zukunft näher untersucht werden sollte. Für das WNV konnte bspw. bereits eine spezifische Funktion von Rab8B für den Transport der Viruspartikel vom RE zur PM gezeigt werden (Kobayashi et al., 2016). Auch das Rab14, das den Transport von HIV-*env* über das RE vermittelt, weist höhere mRNA-Mengen in MARV-infizierten Zellen auf. Weiterhin zeigen auch diverse Rab11-FIP-Proteine (Rab11-FIP2, -FIP4, -FIP5) mit bekannten Funktionen im endosomalen Recycling-System eine zumindest moderate Hochregulation (Machesky, 2019). Insbesondere das Rab11-FIP2 ist dabei als direkter Interaktionspartner von Myosin Vb von besonderem Interesse, dessen Rolle für den Transport von MARV-GP z.B. durch die Überexpression der gut etablierten DN Mutanten überprüft werden könnte



**Abb. 6.1:** Analyse der differentiellen Expression von 20 ausgewählten Genen mit Funktionen im endosomalen Recycling-System nach Infektion mit dem MARV.

Heat Map der differentiellen Expression von Genen mit Funktionen im endosomalen Recycling-System in MARV-infizierten humanen primären proximalen Tubuluszellen (PTC). Humane PTC wurden mit MARV infiziert und 20 bzw. 40 hpi geerntet. Anschließend wurde die zelluläre mRNA isoliert und die differentielle Expression mittels DESeq2-Analyse kalkuliert. Dabei wurde die Expression in den MARV-infizierten Zellen mit einer uninfizierten 40h-Kontrollprobe verglichen. Die angegebenen Werte repräsentieren die log2-skalierte x-fache Veränderung der Expressionslevel (bspw. steht ein Wert von 1 für eine Verdopplung). Zur besseren Visualisierung sind die Zahlenwerte mit einem Farbcode unterlegt (Legende auf der rechten Seite).

(Hales et al., 2002; Schäfer et al., 2014; Ji et al., 2019). Eine weitere Hochregulation ist bei EHD3 und EHD4 zu beobachten, die mit Recycling-Schritten sowohl im frühen Endosom als auch im RE in Verbindung gebracht werden (Naslavsky und Caplan, 2011).

#### 6.4 Der Transport des Marburg Virus-Glykoproteins in Anwesenheit des Matrixproteins VP40

Die Freisetzung des MARV wird vermittelt durch das Matrixprotein VP40, das an der PM zu einer dichten Matrix oligomerisiert und über eine „Late Domain“ Komponenten des zellulären ESCRT-Komplexes zu den Freisetzungsstellen rekrutiert (Urata et al., 2007; Urata und Yasuda, 2010). Darüber hinaus ist VP40 die treibende Kraft bei der Relokalisation sowohl der Nukleokapside als auch des GP

zu den „*Budding-Sites*“, um deren anschließende Inkorporation in die naszierenden Virionen zu gewährleisten (Kolesnikova et al., 2004b; 2007; Mittler et al., 2007; 2013; Dolnik et al., 2010; Kolesnikova et al., 2012; Schudt et al., 2013). Ein wichtiges Sortierungssignal für die Umverteilung von MARV-GP zu den VP40-reichen Bereichen und die Inkorporation in neue Virionen ist dabei die TMD des GP (Mittler et al., 2007).

Die Redistribution von GP kann sehr gut in transient transfizierten Zellen nachgestellt werden, in denen das VP40 großflächige, periphere Cluster bildet, in denen das GP akkumuliert (Kolesnikova et al., 2004b; Mittler et al., 2007; 2013). Aufgrund der Funktion der VP40-reichen Membranregionen als finale Ziele des mutmaßlich mit RE verknüpften GP-Transports wurde in 5.1.2 untersucht, ob auch diese VP40-Cluster mit RE assoziiert sind. Von den getesteten GFP-gekoppelten Rab-GTPasen zeigten alle, für die eine Lokalisation in RE gezeigt ist, ebenfalls eine Akkumulation in den VP40-Clustern, während dies für keine der früh- bzw. spätendosomalen Rab-GTPasen beobachtet werden konnte (Abb. 5.3). Diese Umverteilung der RE-assoziierten Rab-GTPasen war nicht abhängig von der Expression von MARV-GP, sondern wurde allein durch die Anwesenheit des VP40 induziert. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die VP40-reichen Bereiche an der PM als die finalen Zielorte des Transports von MARV-GP mit Komponenten des endosomalen Recycling-Systems verknüpft sind. Gleichzeitig wird MARV-VP40 allerdings nicht gemeinsam mit GP über das Myosin Vb-assoziierte Recycling-System transportiert, da die Überexpression des DN MyoVb Tail keine Auswirkungen auf die Verteilung von VP40 oder die Formation der Cluster an der PM besaß (5.2.4).

Wie könnte sich also die Zusammenkunft von MARV-GP und MARV-VP40 im Zusammenspiel mit dem Recycling-System abspielen? Vor allem vier Optionen scheinen dabei denkbar, die im Folgenden diskutiert werden sollen. Zur besseren Visualisierung sind diese Möglichkeiten zusätzlich in Abb. 6.2 graphisch dargestellt.

- 1) GP und VP40 werden gemeinsam über das endosomale Recycling-System transportiert, das in dieser Funktion eine zusätzliche endosomale Plattform für die Formation der viralen Hülle darstellt (Initiation der Matrix- und Hüllbildung bereits *vor* Ankunft an der PM).
- 2) GP und VP40 werden gemeinsam über das endosomale Recycling-System transportiert, wobei VP40 die endosomalen Membranen durch eine lose Assoziation seiner dimeren Formen als eine Art „*Shuttle*“ zur PM nutzt. Aufgrund der gemeinsamen Ankunft von GP und VP40 an der PM wird das GP direkt infolge der Matrixbildung und Membranremodellierung durch das VP40 in diesen Bereichen gebunden (Initiation der Matrix- und Hüllbildung *nach* Ankunft an der PM).
- 3) VP40 wird nicht über das endosomale Recycling-System transportiert, aber die VP40-reichen Regionen an der PM bilden Membransubdomänen, die spezifische Zielorte für GP-

haltige Vesikel aus dem RE darstellen. Dadurch wird das GP quasi passiv zu den VP40-reichen Bereichen gelotst.

- 4) GP wird zwar über das endosomale Recycling-System transportiert, aber VP40 besitzt keine spezifische Assoziation mit diesem Kompartiment. Die Umverteilung von GP zum VP40 basiert daher auf einem Mechanismus, der unabhängig von RE ist.

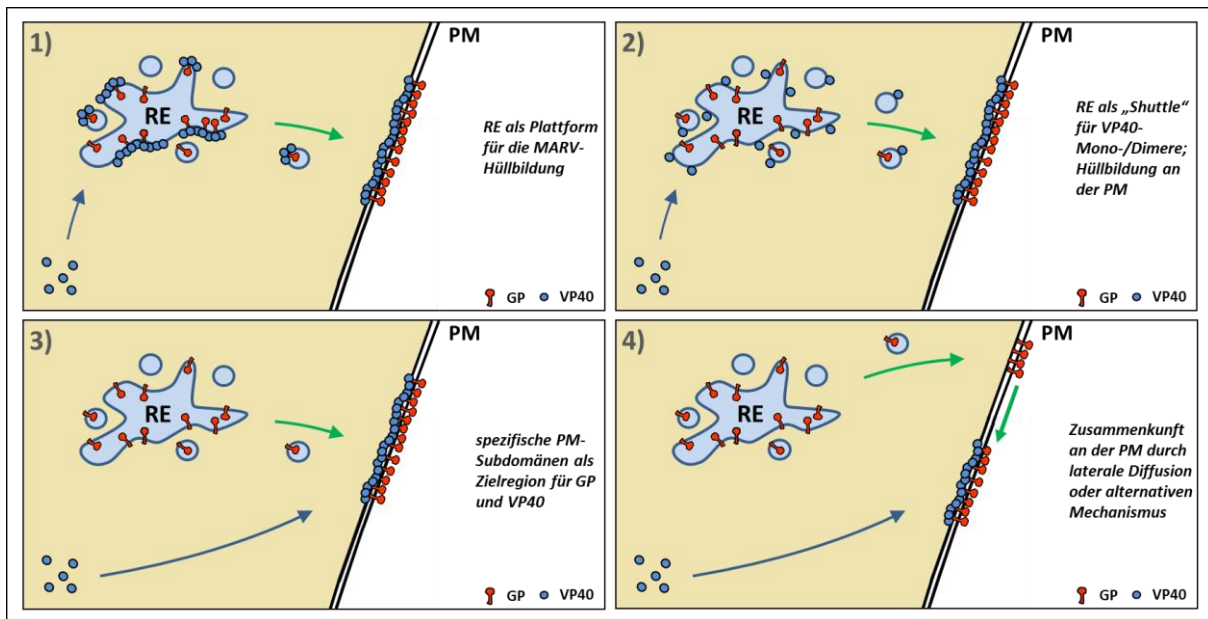
Option 1 würde eine gute Erklärung für die Beobachtung liefern, dass spezifisch Markerproteine des RE in den VP40-Clustern detektiert werden konnten (Abb. 5.3). Durch die beginnende Oligomerisierung des VP40 im RE könnten dabei sowohl GP als auch zelluläre Komponenten des RE eingeschlossen werden und schließlich mit dem VP40 zur PM transportiert werden. Das zelluläre Recycling-System würde in diesem Modell neben den MVBs (Kolesnikova et al., 2002; 2004a; 2004b) eine zweite endosomale Plattform für die Bildung der Hülle des MARV darstellen. Für diese These würde auch sprechen, dass das Rab11-assoziierte Recycling-System ebenfalls eine wichtige Rolle für den Transport des eng verwandten EBOV-VP40 besitzt (Nanbo und Ohba, 2018) und dass in aufgereinigten MARV-Partikeln Spuren von Rab11 detektiert werden konnten (Kolesnikova et al., 2002). Darüber hinaus konnte in Lebendzell-Aufnahmen bereits beobachtet werden, dass GP und VP40 in gemeinsamen Strukturen ko-transportiert werden können und beide Proteine außerdem simultan an den gleichen Orten der PM einzutreffen scheinen (Mittler, Schudt, Halwe et al., 2018). Eine solche Zusammenkunft des Matrixproteins und des Oberflächenproteins im endosomalen Recycling-System wird derzeit auch für das *env*- und das *gag*-Protein von HIV-1 diskutiert (Checkley et al., 2011; Kirschman et al., 2018). Deutlich gegen diese These spricht jedoch, dass die Überexpression des DN MyoVb Tail zwar den Transport von MARV-GP inhibiert, aber keinen Effekt auf die Verteilung von VP40 und/oder die Bildung von VP40-Clustern an der PM hat (Abb. 5.11 C). Auch ist weiterhin unklar, ob der beobachtete Ko-Transport von GP und VP40 (Mittler, Schudt, Halwe et al., 2018) tatsächlich in Richtung der PM verlief oder andere Regionen in der Zelle zum Ziel hatte bzw. eventuell auch degradative Kompartimente zeigte. Zudem konnte eine Kolo-kalisation von MARV-VP40 und RE-Markerproteinen ausschließlich in den an der PM lokalisierten Clustern beobachtet werden (Abb. 5.3). Weder in transfizierten noch in MARV-infizierten Zellen konnten außerhalb der Peripherie distinkte VP40-positive Strukturen detektiert werden, die in zentralen Zellbereichen fast nur diffus erschienen. Darüber hinaus konnte die Assoziation von GFP-Rab11 und VP40 in MARV-infizierten Zellen nicht reproduziert werden, sondern Rab11 war fast ausschließlich gemeinsam mit GP in perinukleären und intermediären Regionen lokalisiert, während das GP in der Peripherie seine Assoziation mit Rab11 verlor und stattdessen in filamentösen VP40-Strukturen zu finden war, in denen kein Rab11 detektiert werden konnte (Abb. 5.5). Diese Beobachtungen sprechen daher gegen eine beginnende Bildung der viralen Hülle in intrazellulären Kompartimenten wie dem Recycling-System.



In Option 2 würde die VP40-Matrixbildung erst an der PM initiiert, während VP40-Dimere lose mit dem RE assoziiert wären und dieses als eine Art „*Shuttle*“ zur PM nutzen. Dieses Modell würde einerseits einen gemeinsamen Ko-Transport von GP und VP40 zulassen, andererseits aber erklären, warum meist nur an der PM distinkte VP40-Strukturen detektiert werden können. Gegen diese These spricht allerdings erneut, dass die Überexpression des DN MyoVb Tail nicht mit dem Transport von MARV-VP40 interferiert.

Option 3 würde diesen Konflikt dahingehend auflösen, dass nur GP, aber nicht VP40, über das endosomale Recycling-System transportiert wird. Die VP40-reichen Regionen an der PM könnten dennoch spezifische Subdomänen repräsentieren, die als bevorzugte Ziele für GP-haltige Transportvesikel aus dem RE dienen. Dies würde erklären, warum GP, die RE-Markerproteine und VP40 gemeinsam in den Clustern an der PM detektiert werden können, aber nur der Transport von GP und der RE-Markerproteine, jedoch nicht der Transport von VP40, durch die MyoVb Tail-induzierte Blockade des Recycling-Systems inhibiert wird. Es ist bekannt, dass die PM-Organisation die Bildung von Subdomänen mit spezifischer Lipid- und Proteinzusammensetzung einschließt, auch wenn die Grundlagen ihrer Genese und Kommunikation mit intra- und extrazellulären Strukturen oft noch nicht detailliert aufgeklärt sind. Beispiele für solche Subdomänen sind z.B. die bereits erwähnten „*Lipid Rafts*“, deren Rolle für den Transport von filoviralen Proteinen derzeit diskutiert wird (Bavari et al., 2002; Lopez et al., 2012), oder auch gitterartige Galectin-Cluster, in denen vor allem Glykoproteine (zu denen auch MARV-GP gehört) zu finden sind (Lajoie et al., 2009). Denkbar wäre auch eine Kombination aus den Modellen 2 und 3, in dem das Recycling-System nur eine Komponente des Transports von VP40 darstellt, das bei Blockade dieses Systems durch MyoVb Tail allerdings auf andere „*Shuttles*“ ausweichen kann. So würde das VP40 auch bei Expression des DN MyoVb Tail noch immer zur PM gelangen, könnte aber das GP, das das Recycling-System nicht verlassen kann, nicht mehr rekrutieren.

Schließlich bliebe auch die Möglichkeit, dass der Transport und die Matrixbildung des VP40 vollkommen unabhängig vom endosomalen Recycling-System verläuft (Option 4). In diesem Modell würden GP und VP40 separat zur PM transportiert, an der schließlich GP z.B. durch laterale Diffusion in die VP40-reichen Regionen einwandert. Der Einschluss der RE-Markerproteine in den VP40-Clustern müsste dabei durch einen mehr oder weniger zufälligen Mechanismus geschehen, der auch andere PM-ständige Proteine betreffen würde. Für diese These spricht die eher artifizielle Natur der VP40-Cluster, die zwar die primäre VP40-Verteilung in transfizierten Zellen repräsentieren, die allerdings kaum in infizierten Zellen detektiert werden können und daher wahrscheinlich aufgrund einer ineffizienten oder fehlerhaften Freisetzung des VP40 von der PM entstehen. Die zunehmende Akkumulation von immer mehr VP40 an der PM könnte schließlich eine fortschreitende



**Abb. 6.2: Mögliche Transportwege von MARV-GP und -VP40 in Verbindung mit dem endosomalen Recycling-System.**

(1) GP und VP40 werden gemeinsam über das endosomale Recycling-System transportiert, das in dieser Funktion eine zusätzliche endosomale Plattform für die Formation der viralen Hülle darstellt (*Initiation der Matrix- und Hüllbildung bereits vor Ankunft an der PM*). (2) GP und VP40 werden gemeinsam über das endosomale Recycling-System transportiert, wobei VP40 die endosomalen Membranen durch eine lose Assoziation seiner dimeren Formen als eine Art „Shuttle“ zur PM nutzt. Aufgrund der gemeinsamen Ankunft von GP und VP40 an der PM wird das GP direkt infolge der Matrixbildung und Membranremodellierung durch das VP40 in diesen Bereichen gebunden (*Initiation der Matrix- und Hüllbildung nach Ankunft an der PM*). (3) VP40 wird nicht über das endosomale Recycling-System transportiert, aber die VP40-reichen Regionen an der PM bilden Membransubdomänen, die spezifische Zielorte für GP-haltige Vesikel aus dem RE darstellen. Dadurch wird das GP quasi passiv zu den VP40-reichen Bereichen gelotet. (4) GP wird zwar über das endosomale Recycling-System transportiert, aber VP40 besitzt keine spezifische Assoziation mit diesem Kompartiment. Die Umverteilung von GP zum VP40 basiert daher auf einem Mechanismus, der unabhängig von RE ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen eher gegen einen Transport von VP40 über das endosomale Recycling-System (Optionen 1 und 2) und für einen separaten Transport von GP und VP40 (Option 3 oder 4).

RE: Recycling Endosom; PM: Plasmamembran.

Membranwölbung induzieren, was schließlich auch zum Einschluss von verschiedenen zellulären Proteinen führen könnte. Dafür spricht, dass auch weitere zelluläre Komponenten der PM wie Cholesterol und das Gangliosid GM1 in den Clustern detektiert werden können (Dolnik et al., 2008; Köhler et al., 2015). Scanning-elektronenmikroskopische Analysen dieser GM1-positiven VP40-Cluster zeigten, dass es sich hierbei tatsächlich vor allem um starke VP40-induzierte Ansammlungen von Membranen handelte. Daher wurde diskutiert, ob die Akkumulation von GM1 in diesen Clusterregionen nicht durch eine spezifisch erhöhte Konzentration von GM1 pro Membraneinheit, sondern eher durch die erhöhte Menge an Membranen per se aufgetreten sein könnte (Dolnik et al., 2008). Eine derart unspezifische Akkumulation zellulärer Strukturen in den VP40-Clustern infolge einer ineffizienten Freisetzung von VP40-haltigen Partikeln an der PM würde zudem mit der Beobachtung übereinstimmen, dass freigesetzte, filamentöse Partikel weitgehend frei von zellulären Bestandteilen sind (Kolesnikova et al., 2009). Im Falle einer effizienten Freisetzung scheinen also zelluläre Strukturen aus dem „Budding“-Prozess ausgeschlossen zu werden, während im Falle einer ineffizienten Freisetzung die Bildung von VP40-Clustern beobachtet werden kann, in denen auch zelluläre Proteine

detektiert werden können. Dieses Muster könnte auch der Grund für die Lokalisation der fremden viralen Glykoproteine in den Clustern sein (Abb. 5.16 C). Dennoch würde diese Erklärung nur teilweise auf die Rab-GTPasen zutreffen, die ebenfalls in den Clustern detektiert werden konnten (Abb. 5.3), aber im Gegensatz zu den mehr oder minder PM-ständigen Glykoproteinen als Teil ihres GDP/GTP-Zyklus zwischen verschiedenen Kompartimenten pendeln (Stenmark, 2009). Da die RE-assoziierten Rab-GTPasen zwischen dem RE und der PM pendeln, hätten sie nur einen vorübergehenden Kontakt mit der PM, bevor sie wieder zu ihren Donor-Membranen zurückkehren (Stenmark, 2009). Ein Einschluss dieser pendelnden Proteine in den VP40-Membranclustern ist daher vor allem vorstellbar, wenn die VP40-reichen Regionen gleichzeitig Zielregionen für diese Rab-GTPasen darstellen. Aufgrund der höheren Wahrscheinlichkeit, sich in der Nähe des VP40 aufzuhalten, könnte daher ein kurzer Kontakt während des Zyklus ausreichen, um in einer dieser Membranwölbungen eingeschlossen zu werden. Dies würde allerdings erneut für eine spezifische Verknüpfung der VP40-reichen Regionen mit dem endosomalen Recycling-System sprechen, wenn auch eher als Ziel-Subdomäne an der PM und nicht als Transit-Kompartiment während des intrazellulären Transports von VP40 (s. Option 3).

In Bezug auf die Freisetzung des MARV ist bekannt, dass die zusätzliche Expression von NP und GP die VP40-induzierte Freisetzung von Partikeln an der PM erhöht (Kolesnikova et al., 2004b; Swenson et al., 2004; Wenigenrath et al., 2010), wobei sowohl die Rekrutierung von ESCRT-Komponenten durch NP als auch der Tetherin-Antagonismus von GP eine Rolle spielen (Dolnik et al., 2010; Gnirß et al., 2014). Dennoch sind die detaillierten Prozesse, die letztendlich determinieren, ob es zu einer effizienten Partikelfreisetzung wie in MARV-infizierten Zellen kommt oder ob sich die für transfizierte Zellen charakteristischen VP40-Cluster bilden, weitgehend unbekannt. Um diese Frage zu beantworten, könnten zukünftige Studien darauf abzielen, die Interaktion von VP40 mit zellulären Komponenten näher zu charakterisieren und dabei insbesondere zu analysieren, welches Milieu an zellulären (und viralen) Faktoren für eine Anreicherung von VP40 an der PM sowie für eine anschließende effiziente Freisetzung benötigt wird. Neben zellulären Proteinen sind in den letzten Jahren auch Hinweise gefunden worden, dass bestimmte Lipidkompositionen die Matrixbildung von VP40 begünstigen (Wijesinghe und Stahelin, 2015; Wijesinghe et al., 2017; Bhattarai et al., 2017). Im Hinblick auf GP und die Bildung der MARV-Hülle ergibt sich vor diesem Hintergrund die Frage, ob vielleicht auch GP präferentiell in genau den Lipidmikrodomänen lokalisiert ist, die auch letztlich für die Matrixbildung von VP40 benötigt werden. Ein Phospholipid, für das eine wichtige Rolle bei der VP40-Matrixbildung gezeigt werden konnte, ist das PS (Wijesinghe und Stahelin, 2015; Wijesinghe et al., 2017), das nicht nur an der inneren Seite der PM zu finden ist, sondern interessanterweise auch in RE angereichert und in Transportprozesse eingebunden ist (Yeung et al., 2008; Fairn et al., 2011; Uchida et al., 2011; Lee et al., 2015; Tanaka et al., 2016). Daraus ließe sich eine weitere mögliche Hypothese zur Bildung der Hülle

des MARV formulieren, die den in dieser Arbeit beobachteten Transport von GP über RE mit der Affinität von VP40 zu bestimmten Lipiden wie PS verbindet.

Die Zusammenkunft von GP und VP40 im Vorfeld der Bildung der viralen Hülle stellt einen wesentlichen Schritt bei der Produktion infektiöser Virionen dar. Das Verständnis dieses Prozesses ist daher auch im Hinblick auf potentielle antivirale Interventionsmöglichkeiten ein wichtiges Aufgabenfeld weiterer Forschung zum MARV. Unabhängig davon, ob VP40 selbst RE für seinen Transport nutzt, könnte eine spezifische Rekrutierung von RE zu den VP40-angereicherten Membranregionen eine Strategie des MARV darstellen, um das GP aus dem Recycling-System zu den viralen „*Budding-Sites*“ zu lotsen. Es wird allerdings weiteren, eingehenden Untersuchungen obliegen, die genauen Mechanismen aufzuklären, die die Matrixbildung des VP40 an der PM und die Rekrutierung von GP zu diesen Membranregionen steuern und welche Rolle endosomalen Kompartimenten bei diesem Prozess im Detail zukommt.

### **6.5 Die Rolle des Myosin Vb-assoziierten Recycling-Systems für den Transport weiterer viraler Oberflächenproteine**

Die Beobachtung, dass neben dem MARV-GP in den hier durchgeführten Versuchen auch das EBOV-GP, das NiV-G, das IAV-HA sowie in abgeschwächter Form auch das NiV-F und das VSV-G eine Sensibilität gegenüber der Überexpression des MyoVb Tail zeigten, spricht dafür, dass all diese viralen Oberflächenproteine Transportwegen folgen, die zumindest partiell mit dem Myosin Vb-assoziierten Recycling-System überlappen. Auf den ersten Blick erscheint dies für einige dieser Proteine nachvollziehbar, da bspw. für das NiV-F und das VSV-G ein Transit des RE gezeigt ist (Ang et al., 2004; Nokes et al., 2008; Diederich et al., 2012). Auch das NiV-G erfährt eine, wenn auch im Vergleich mit NiV-F langsamere, Re-Endozytose und passiert wahrscheinlich auf dem Weg zurück zur PM das Recycling-System (Vogt et al., 2005). Das VSV-G hingegen folgt in polarisierten Zellen als basolateral sortiertes Protein einer über das CRE verlaufenden Route, die nicht sensitiv gegenüber der Überexpression des Myosin Vb Tail ist (Cresawn et al., 2007). Auch für das apikale IAV-HA konnte bereits gezeigt werden, dass es in polarisierten MDCK-Zellen keine Sensibilität gegenüber der Blockade des ARE-Transportwegs durch das MyoVb Tail zeigt und stattdessen über apikale frühe Endosomen zur PM gelangt (Cresawn et al., 2007). Allerdings sind all diese Studien in polarisierten Zellen durchgeführt worden, in denen die endosomalen Kompartimente einer biochemischen und physischen Trennung in apikale und basolaterale Subtypen unterliegen. So ist das endosomale Recycling-System in polarisierten Zellen in das ARE und das CRE unterteilt, neben denen zusätzlich apikale und basolaterale frühe Endosomen existieren (Ellis et al., 2006; Weisz und Rodriguez-Boulán, 2009; Ang und Fölsch,

2012; Stoops und Caplan, 2014). Im Gegensatz dazu sind diese Transportwege in unpolarisierten Zellen mehr oder weniger überlappend. Aus diesem Grund ist es gut denkbar, dass die Überexpression des MyoVb Tail in unpolarisierten Zellen auch Transportrouten von Proteinen betrifft, die in polarisierten Zellen einen ARE- und damit MyoVb-unabhängigen Transport nutzen. Experimentell ist diese These bereits für das Recycling von Tfn gezeigt, das in polarisierten Zellen das Rab11-negative CRE passiert und dabei keine Sensitivität gegenüber dem DN MyoVb Tail aufweist, während das Tfn-Recycling in unpolarisierten Zellen über Rab11-positive RE verläuft und durch die Überexpression von MyoVb Tail inhibiert wird (Ullrich et al., 1996; Wang et al., 2000; Lapierre et al., 2001). Auch für das VSV-G ist eine Sensitivität gegenüber DN Rab11-Mutanten gezeigt, obwohl es in polarisierten Zellen über das CRE transportiert wird (Chen et al., 1998; Ang et al., 2004; Ang und Fölsch, 2012). Zudem wurde in 6.3.2 bereits die unterschiedliche Abhängigkeit des MeV/MuV-Nukleokapsid-Transports von Rab11 in polarisierten und unpolarisierten Zellen diskutiert (Nakatsu et al., 2013).

Vor diesem Hintergrund sind die umfassenden Effekte des MyoVb Tails auf alle untersuchten viralen Oberflächenproteine am wahrscheinlichsten damit zu erklären, dass alle diese Proteine in unpolarisierten Zellen auf ihrem Weg zur PM in Kontakt mit Myosin Vb-positiven Kompartimenten kommen. Denkt man diese These etwas weiter, könnte dies sogar ein Hinweis sein, dass das endosomale Recycling-System generell in unpolarisierten Zellen enger mit dem sekretorischen Pfad zusammenhängen könnte als bisher angenommen und somit möglicherweise auch viele zelluläre Proteine das Recycling-System auf dem Weg zur PM passieren. Für eine Reihe zellulärer Proteine wie den TfR oder das E-Cadherin konnte ein Transit des RE in unpolarisierten Zellen auch tatsächlich bereits gezeigt werden (Futter et al., 1995; Lock und Stow, 2005). Dennoch sind weitere Experimente notwendig, um die genaue Verflechtung dieses endosomalen Kompartiments mit dem Transport von verschiedenen zellulären und viralen Proteinen zur Zelloberfläche im Detail aufzudecken.

## 6.6 Abschließende Bemerkungen

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Transport des MARV-GP zwischen dem Golgi-Apparat und der PM näher zu charakterisieren. Dabei konnte eine bisher unbekannte Rolle des endosomalen Recycling-Systems aufgedeckt werden, dessen funktionelle Ablation zu einer Inhibition des Oberflächentransports von GP führte. Auch wenn diese Erkenntnis einen Schritt zum besseren Verständnis der intrazellulären Transportrouten des MARV-GP darstellt, bleiben noch viele Fragen offen, die in zukünftigen Experimente adressiert werden sollten.

Eine dieser Fragen betrifft die Art von Transportsignalen, die die Beförderung des MARV-GP zur PM vermitteln. Es wurde bereits gezeigt, dass die TMD von MARV-GP ein wichtiges Signal für die Relokalisation von GP in die VP40-Cluster und für die anschließende Inkorporation in neue Partikel

besitzt (Kolesnikova et al., 2004b; Mittler et al., 2007; 2013). Unbekannt ist allerdings, ob die TMD das einzige Sortierungssignal für MARV-GP darstellt oder ob noch weitere, möglicherweise auch synergistische oder konkurrierende, Signale existieren. Wie bereits an anderer Stelle diskutiert, sind die wichtigsten Sortierungssignale für apikale Proteine wie das MARV-GP vor allem in der TMD oder in spezifischen N- bzw. O-Glykanen zu finden (Weisz und Rodriguez-Boulan, 2009).

Für das eng verwandte GP des EBOV konnte gezeigt werden, dass die N-Glykane an den Positionen N563 und N618 essentiell für den Transport und die Inkorporation in neue Viruspartikel sind (Lennemann et al., 2015; Wang et al., 2017). Da diese N-Glykosylierungsstellen auch im MARV-GP konserviert sind (N564 bzw. N619), liegt es nahe, zu spekulieren, dass diese N-Glykane hier ähnliche Funktionen besitzen. Zudem befinden sie sich an einer für die Fusionsaktivität des GP wichtigen Stelle am Beginn der NHR/CHR, die durch die Glykosylierung wahrscheinlich vor dem Immunsystem abgeschirmt werden. Die Verknüpfung dieser Glykane mit einer zusätzlichen Rolle als Transportsignal könnte vielleicht eine Art Qualitätskontrolle darstellen, damit nur solches GP zur Oberfläche und in neue Partikel gelangt, dessen fusionsaktive Domänen einerseits korrekt gefaltet und andererseits gleichzeitig vor dem Immunsystem abgeschirmt sind. Zellbiologische Studien in polarisierten Zellen haben gezeigt, dass der N-Glykan-abhängige Transport von apikalen Proteinen durch das Myosin Vb-assoziierte ARE führt (Potter et al., 2004; 2006; Cresawn et al., 2007; Weisz und Rodriguez-Boulan, 2009), was sich mit der in dieser Arbeit gezeigten Sensitivität von MARV-GP gegenüber dem DN MyoVb Tail decken würde. Zudem wurde für MARV-GP bereits gezeigt, dass die generelle Inhibition der N-Glykosylierung durch Tunicamycin den Oberflächentransport blockiert (Becker et al., 1996). Aus diesem Grund wäre eine genauere Untersuchung der Rolle von N-Glykanen, insbesondere an den Stellen N564 und N619, für den Transport von MARV-GP ein vielversprechender Ansatz.

Eine weitere Möglichkeit wäre ein *Lipid-Raft*-vermittelter Transport, der für die filoviralen Glykoproteine aufgrund divergenter Ergebnisse Gegenstand einer aktuellen Debatte ist (Bavari et al., 2002; Lopez et al., 2012; Mittler et al., 2013). Als Signal für die Sortierung in *Lipid Rafts* käme erneut die hydrophobe und acylierte TMD von MARV-GP infrage. Allerdings konnte bereits gezeigt werden, dass die Acylierung von GP am C-terminalen Ende der TMD gemeinsam mit der kurzen CD eher eine stabilisierende Funktion für die Proteinstruktur besitzt und keinen Einfluss auf die Inkorporation von GP in VLPs ausübt (Mittler et al., 2013). Mit spezifischen Cholesterol-bindenden Motiven wurden kürzlich weitere Möglichkeiten entdeckt, wie Proteine mit Membrankomponenten interagieren können (Li und Papadopoulos, 1998; Baier et al., 2011; Fantini et al., 2016). Das sog. CRAC („*cholesterol recognition/interaction amino acid consensus*“) -Motiv besteht dabei aus der Konsensussequenz „(L/V)-X<sub>1-5</sub>-(Y)-X<sub>1-5</sub>-(K/R)“ und ist meistens an dem zur Membraninnenseite gerichteten Abschnitt der TMD der Cholesterol-bindenden Proteine lokalisiert. Mit dem CARC-Motiv existiert daneben ein gespiegeltes Analogon des CRAC-Motivs mit der Konsensus-Sequenz „(K/R)-X<sub>1-5</sub>-(Y/F)-X<sub>1-5</sub>-(L/V)“ an

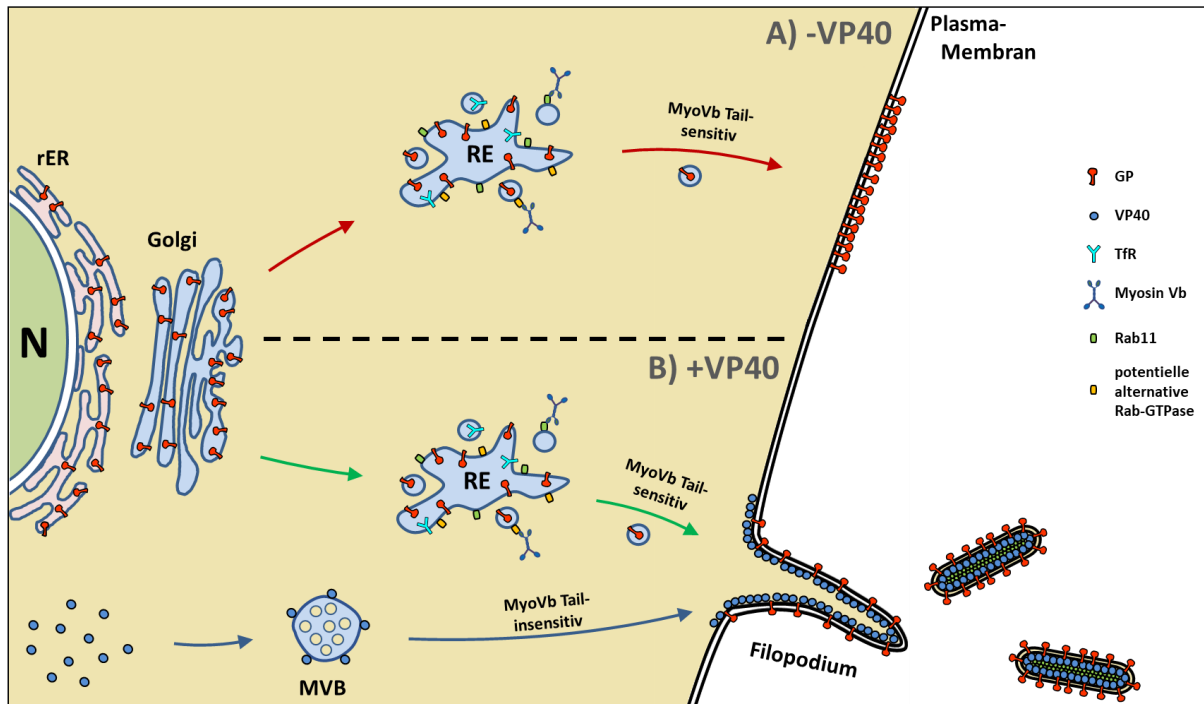


dem zur Membranaußenseite gerichteten Abschnitt der TMD (Baier et al., 2011; Fantini et al., 2016). Zudem deuten Mutationsexperimente darauf hin, dass die zentrale AS im CARC-Motiv durch eine beliebige aromatische AS, also auch W ersetzt werden kann (Fantini et al., 2016). Dass diese Cholesterol-bindenden Motive auch für virale Proteine eine Bedeutung haben können, konnte für das IAV-HA gezeigt werden, dessen Transport und Lokalisation in *Lipid Rafts* u.a. von der Bindung an Cholesterol abhängt (de Vries et al., 2015). Schaut man sich die Sequenz der TMD des MARV-GP genauer an, findet sich am Übergang der ED zur TMD die Sequenz „KWWTSDWGVL“, die in die Definition des (um W erweiterten) CARC-Motivs passen würde. Interessant wird diese Beobachtung insbesondere vor dem Hintergrund, dass das zelluläre Cholesterol-Recycling auch mit Rab8 und Myosin Vb zusammenzuhängen scheint (Kanerva et al., 2013).

Schließlich ist es auch möglich, dass MARV-GP all diese potentiellen Sortierungssignale und damit verschiedene Transportwege zur PM nutzt. Um die genauen intrazellulären Routen des GP-Transports aufzudecken, bilden die o.g. potentiellen Transportsignale gute Ansatzpunkte für weiterführende Studien.

Das MARV-GP besitzt als einziges Oberflächenprotein des MARV essentielle Funktionen für den Eintritt der Viren in die Zielzellen sowie deren Infektion. Aus diesem Grund kann ein besseres Verständnis der Transportmechanismen, die zu einer korrekten Inkorporation des GP in neue Viruspartikel führen, letztlich die Grundlage für die Identifizierung neuer, potentieller Interventionsmöglichkeiten gegen das hochpathogene MARV ermöglichen.

Das Arbeitsmodell des GP-Transports unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Arbeit ist abschließend in Abb. 6.3 noch einmal bildlich zusammengefasst.



**Abb. 6.3: Arbeitsmodell des intrazellulären Transports von MARV-GP.**

MARV-GP wird als Typ I-Transmembranprotein im rER synthetisiert und über den klassischen sekretorischen Transportweg weiter zum Golgi-Apparat transportiert. (A) Bei solitärer Expression passiert GP das endosomale Recycling-System, in dem es mit dem TfR, Rab11 und Myosin Vb kolokalisiert, und wird anschließend von dort weiter zur PM transportiert. Der Weitertransport zur PM kann durch die funktionelle Ablation des endosomalen Recycling-Systems infolge der Expression des DN Myosin Vb Tail inhibiert werden. Die kleine GTPase Rab11 ist zwar in den RE präsent, spielt aber keine funktionelle Rolle im Transport von GP, der durch eine alternative Rab-GTPase reguliert werden könnte. (B) In Koexpression mit dem Matrixprotein VP40 folgt GP dem gleichen Transportweg wie in (A), während VP40 im Zytoplasma synthetisiert wird und zunächst mit kleinen Vesikeln und MVBs assoziiert. Von dort wird VP40 separat über einen Transportweg, der nicht sensitiv gegenüber dem DN Myosin Vb Tail ist, zur PM transportiert. An der PM rekrutiert VP40 das GP zu den viralen „Budding-Sites“ an Filopodien. Auch der Transport von GP zu den VP40-angereicherten Regionen an der PM kann durch die Inhibition des endosomalen Recycling-Systems durch das DN Myosin Vb Tail blockiert werden.

*N:* Nukleus; *rER:* raues endoplasmatisches Retikulum; *RE:* Recycling Endosom; *MVB:* Multivesikulärer Körper; *Tfr:* Transferrin-Rezeptor.

## 7 Referenzen

- ADJEMIAN, J., FARNON, E. C., TSCHIOKO, F., WAMALA, J. F., BYARUHANGA, E., BWIRE, G. S., KANSIIME, E., KAGIRITA, A., AHIMBISIBWE, S., KATUNGUKA, F., JEFFS, B., LUTWAMA, J. J., DOWNING, R., TAPPERO, J. W., FORMENTY, P., AMMAN, B., MANNING, C., TOWNER, J., NICHOL, S. T. & ROLLIN, P. E. 2011. Outbreak of Marburg hemorrhagic fever among miners in Kamwenge and Ibanda Districts, Uganda, 2007. *J Infect Dis*, 204 Suppl 3, S796-9.
- ALEKSANDROWICZ, P., MARZI, A., BIEDENKOPF, N., BEIMFORDE, N., BECKER, S., HOENEN, T., FELDMANN, H. & SCHNITTLER, H. J. 2011. Ebola virus enters host cells by macropinocytosis and clathrin-mediated endocytosis. *J Infect Dis*, 204 Suppl 3, S957-67.
- AMORIM, M. J., BRUCE, E. A., READ, E. K., FOEGLEIN, A., MAHEN, R., STUART, A. D. & DIGARD, P. 2011. A Rab11- and microtubule-dependent mechanism for cytoplasmic transport of influenza A virus viral RNA. *J Virol*, 85, 4143-56.
- ANANTPADMA, M., KOUZNETSOVA, J., WANG, H., HUANG, R., KOLOKOLTSOV, A., GUHA, R., LINDSTROM, A. R., SHTANKO, O., SIMEONOV, A., MALONEY, D. J., MAURY, W., LACOUNT, D. J., JADHAV, A. & DAVEY, R. A. 2016. Large-Scale Screening and Identification of Novel Ebola Virus and Marburg Virus Entry Inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*, 60, 4471-81.
- ANG, A. L., FOLSCH, H., KOIVISTO, U. M., PYPAERT, M. & MELLMAN, I. 2003. The Rab8 GTPase selectively regulates AP-1B-dependent basolateral transport in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol*, 163, 339-50.
- ANG, A. L., TAGUCHI, T., FRANCIS, S., FOLSCH, H., MURRELLS, L. J., PYPAERT, M., WARREN, G. & MELLMAN, I. 2004. Recycling endosomes can serve as intermediates during transport from the Golgi to the plasma membrane of MDCK cells. *J Cell Biol*, 167, 531-43.
- ANG, S. F. & FOLSCH, H. 2012. The role of secretory and endocytic pathways in the maintenance of cell polarity. *Essays Biochem*, 53, 29-39.
- ARBEITSMEDIZIN, B. F. A. U. 2012. TRBA 462 "Einstufung von Viren in Risikogruppen". In: ARBEITSMEDIZIN, B. F. A. U. (ed.).
- ARIDOR, M., BANNYKH, S. I., ROWE, T. & BALCH, W. E. 1995. Sequential coupling between COPII and COPI vesicle coats in endoplasmic reticulum to Golgi transport. *J Cell Biol*, 131, 875-93.
- ARMSTRONG, J., THOMPSON, N., SQUIRE, J. H., SMITH, J., HAYES, B. & SOLARI, R. 1996. Identification of a novel member of the Rab8 family from the rat basophilic leukaemia cell line, RBL.2H3. *J Cell Sci*, 109 ( Pt 6), 1265-74.
- BABBEY, C. M., AHKTAR, N., WANG, E., CHEN, C. C., GRANT, B. D. & DUNN, K. W. 2006. Rab10 regulates membrane transport through early endosomes of polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell*, 17, 3156-75.
- BAI, C. Q., MU, J. S., KARGBO, D., SONG, Y. B., NIU, W. K., NIE, W. M., KANU, A., LIU, W. W., WANG, Y. P., DAFAR, F., YAN, T., HU, Y., DENG, Y. Q., LU, H. J., YANG, F., ZHANG, X. G., SUN, Y., CAO, Y. X., SU, H. X., LIU, W. S., WANG, C. Y., QIAN, J., LIU, L., WANG, H., TONG, Y. G., LIU, Z. Y., CHEN, Y. S., WANG, H. Q., KARGBO, B., GAO, G. F. & JIANG, J. F. 2016. Clinical and Virological Characteristics of Ebola Virus Disease Patients Treated With Favipiravir (T-705)-Sierra Leone, 2014. *Clin Infect Dis*, 63, 1288-1294.
- BAIER, C. J., FANTINI, J. & BARRANTES, F. J. 2011. Disclosure of cholesterol recognition motifs in transmembrane domains of the human nicotinic acetylcholine receptor. *Sci Rep*, 1, 69.
- BALE, S., JULIEN, J. P., BORNHOLDT, Z. A., KIMBERLIN, C. R., HALFMANN, P., ZANDONATTI, M. A., KUNERT, J., KROON, G. J., KAWAOKA, Y., MACRAE, I. J., WILSON, I. A. & SAPHIRE, E. O. 2012. Marburg virus VP35 can both fully coat the backbone and cap the ends of dsRNA for interferon antagonism. *PLoS Pathog*, 8, e1002916.
- BAMBERG, S., KOLESNIKOVA, L., MOLLER, P., KLENK, H. D. & BECKER, S. 2005. VP24 of Marburg virus influences formation of infectious particles. *J Virol*, 79, 13421-33.
- BANDYOPADHYAY, D., CYPHERSMITH, A., ZAPATA, J. A., KIM, Y. J. & PAYNE, C. K. 2014. Lysosome transport as a function of lysosome diameter. *PLoS One*, 9, e86847.

- BASLER, C. F. & AMARASINGHE, G. K. 2009. Evasion of interferon responses by Ebola and Marburg viruses. *J Interferon Cytokine Res*, 29, 511-20.
- BAVARI, S., BOSIO, C. M., WIEGAND, E., RUTHEL, G., WILL, A. B., GEISBERT, T. W., HEVEY, M., SCHMALJOHN, C., SCHMALJOHN, A. & AMAN, M. J. 2002. Lipid raft microdomains: a gateway for compartmentalized trafficking of Ebola and Marburg viruses. *J Exp Med*, 195, 593-602.
- BECKER, S., HUPPERTZ, S., KLENK, H. D. & FELDMANN, H. 1994. The nucleoprotein of Marburg virus is phosphorylated. *J Gen Virol*, 75 ( Pt 4), 809-18.
- BECKER, S., KLENK, H. D. & MUHLBERGER, E. 1996. Intracellular transport and processing of the Marburg virus surface protein in vertebrate and insect cells. *Virology*, 225, 145-55.
- BECKER, S., RINNE, C., HOFSSASS, U., KLENK, H. D. & MUHLBERGER, E. 1998. Interactions of Marburg virus nucleocapsid proteins. *Virology*, 249, 406-17.
- BECKER, S., SPIESS, M. & KLENK, H. D. 1995. The asialoglycoprotein receptor is a potential liver-specific receptor for Marburg virus. *J Gen Virol*, 76 ( Pt 2), 393-9.
- BEER, B., KURTH, R. & BUKREYEV, A. 1999. Characteristics of Filoviridae: Marburg and Ebola viruses. *Naturwissenschaften*, 86, 8-17.
- BELL BP, D. I., JERNIGAN DB, ET AL. 2016. Overview, Control Strategies, and Lessons Learned in the CDC Response to the 2014–2016 Ebola Epidemic. *MMWR*, Suppl 2016;65(Suppl-3):4–11.
- BHARAT, T. A., RICHES, J. D., KOLESNIKOVA, L., WELSCH, S., KRAHLING, V., DAVEY, N., PARSY, M. L., BECKER, S. & BRIGGS, J. A. 2011. Cryo-electron tomography of Marburg virus particles and their morphogenesis within infected cells. *PLoS Biol*, 9, e1001196.
- BHATTARAI, N., GC, J. B., GERSTMAN, B. S., STAHELIN, R. V. & CHAPAGAIN, P. P. 2017. Plasma membrane association facilitates conformational changes in the Marburg virus protein VP40 dimer. *RSC Adv*, 7, 22741-22748.
- BHUIN, T. & ROY, J. K. 2014. Rab proteins: The key regulators of intracellular vesicle transport. *Exp Cell Res*.
- BIEBERICH, E. 2014. Synthesis, Processing, and Function of N-glycans in N-glycoproteins. *Adv Neurobiol*, 9, 47-70.
- BIEDENKOPF, N., HARTLIEB, B., HOENEN, T. & BECKER, S. 2013. Phosphorylation of Ebola virus VP30 influences the composition of the viral nucleocapsid complex: impact on viral transcription and replication. *J Biol Chem*, 288, 11165-74.
- BIEDENKOPF, N., LIER, C. & BECKER, S. 2016. Dynamic Phosphorylation of VP30 Is Essential for Ebola Virus Life Cycle. *J Virol*, 90, 4914-4925.
- BIXLER, S. L., BOCAN, T. M., WELLS, J., WETZEL, K. S., VAN TONGEREN, S. A., DONG, L., GARZA, N. L., DONNELLY, G., CAZARES, L. H., NUSS, J., SOLOVEVA, V., KOISTINEN, K. A., WELCH, L., EPSTEIN, C., LIANG, L. F., GIESING, D., LENK, R., BAVARI, S. & WARREN, T. K. 2018. Efficacy of favipiravir (T-705) in nonhuman primates infected with Ebola virus or Marburg virus. *Antiviral Res*, 151, 97-104.
- BOLTE, S. & CORDELIÈRES, F. P. 2006. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc*, 224, 213-32.
- BORNHOLDT, Z. A., NDUNGO, E., FUSCO, M. L., BALE, S., FLYAK, A. I., CROWE, J. E., JR., CHANDRAN, K. & SAPHIRE, E. O. 2016. Host-Primed Ebola Virus GP Exposes a Hydrophobic NPC1 Receptor-Binding Pocket, Revealing a Target for Broadly Neutralizing Antibodies. *MBio*, 7, e02154-15.
- BORNHOLDT, Z. A., NODA, T., ABELSON, D. M., HALFMANN, P., WOOD, M. R., KAWAOKA, Y. & SAPHIRE, E. O. 2013. Structural rearrangement of ebola virus VP40 begets multiple functions in the virus life cycle. *Cell*, 154, 763-74.
- BOSIO, C. M., AMAN, M. J., GROGAN, C., HOGAN, R., RUTHEL, G., NEGLEY, D., MOHAMADZADEH, M., BAVARI, S. & SCHMALJOHN, A. 2003. Ebola and Marburg viruses replicate in monocyte-derived dendritic cells without inducing the production of cytokines and full maturation. *J Infect Dis*, 188, 1630-8.
- BOWEN, E. T., LLOYD, G., HARRIS, W. J., PLATT, G. S., BASKERVILLE, A. & VELLA, E. E. 1977. Viral

- haemorrhagic fever in southern Sudan and northern Zaire. Preliminary studies on the aetiological agent. *Lancet*, 1, 571-3.
- BRAINARD, J., POND, K., HOOPER, L., EDMUNDS, K. & HUNTER, P. 2016. Presence and Persistence of Ebola or Marburg Virus in Patients and Survivors: A Rapid Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis*, 10, e0004475.
- BRANDLY, C. A. & HANSON, R. P. 1957. Epizootiology of vesicular stomatitis. *Am J Public Health Nations Health*, 47, 205-9.
- BROCK, S. C., GOLDENRING, J. R. & CROWE, J. E., JR. 2003. Apical recycling systems regulate directional budding of respiratory syncytial virus from polarized epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 15143-8.
- BRUHN, J. F., KIRCHDOERFER, R. N., URATA, S. M., LI, S., TICKLE, I. J., BRICOGNE, G. & SAPHIRE, E. O. 2017. Crystal Structure of the Marburg Virus VP35 Oligomerization Domain. *J Virol*, 91.
- BUCCI, C., PARTON, R. G., MATHER, I. H., STUNNENBERG, H., SIMONS, K., HOFLACK, B. & ZERIAL, M. 1992. The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell*, 70, 715-28.
- BUKREYEV, A. A., BELANOV, E. F., BLINOV, V. M. & NETESOV, S. V. 1995. Complete nucleotide sequences of Marburg virus genes 5 and 6 encoding VP30 and VP24 proteins. *Biochem Mol Biol Int*, 35, 605-13.
- CARETTE, J. E., RAABEN, M., WONG, A. C., HERBERT, A. S., OBERNOSTERER, G., MULHERKAR, N., KUEHNE, A. I., KRANZUSCH, P. J., GRIFFIN, A. M., RUTHEL, G., DAL CIN, P., DYE, J. M., WHELAN, S. P., CHANDRAN, K. & BRUMMELKAMP, T. R. 2011. Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1. *Nature*, 477, 340-3.
- CASANOVA, J. E., WANG, X., KUMAR, R., BHARTUR, S. G., NAVARRE, J., WOODRUM, J. E., ALTSCHULER, Y., RAY, G. S. & GOLDENRING, J. R. 1999. Association of Rab25 and Rab11a with the apical recycling system of polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell*, 10, 47-61.
- CDC. 2014. *Outbreaks Chronology: Marburg Hemorrhagic Fever | Marburg Hemorrhagic Fever (Marburg HF) | CDC* [Online]. Available: <https://www.cdc.gov/vhf/marburg/outbreaks/chronology.html> [Accessed].
- CHANDRAN, K., SULLIVAN, N. J., FELBOR, U., WHELAN, S. P. & CUNNINGHAM, J. M. 2005. Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection. *Science*, 308, 1643-5.
- CHECKLEY, M. A., LUTTGE, B. G. & FREED, E. O. 2011. HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. *J Mol Biol*, 410, 582-608.
- CHEN, W., FENG, Y., CHEN, D. & WANDINGER-NESS, A. 1998. Rab11 is required for trans-golgi network-to-plasma membrane transport and a preferential target for GDP dissociation inhibitor. *Mol Biol Cell*, 9, 3241-57.
- CHOU, Y. Y., HEATON, N. S., GAO, Q., PALESE, P., SINGER, R. H. & LIONNET, T. 2013. Colocalization of different influenza viral RNA segments in the cytoplasm before viral budding as shown by single-molecule sensitivity FISH analysis. *PLoS Pathog*, 9, e1003358.
- CHU, J. J., CHOO, B. G., LEE, J. W. & NG, M. L. 2003. Actin filaments participate in West Nile (Sarafend) virus maturation process. *J Med Virol*, 71, 463-72.
- CHU, J. J. & NG, M. L. 2002. Trafficking mechanism of West Nile (Sarafend) virus structural proteins. *J Med Virol*, 67, 127-36.
- COFFIN, K. M., LIU, J., WARREN, T. K., BLANCETT, C. D., KUEHL, K. A., NICHOLS, D. K., BEARSS, J. J., SCHELLHASE, C. W., RETTERER, C. J., WEIDNER, J. M., RADOSHITZKY, S. R., BRANNAN, J. M., CARDILE, A. P., DYE, J. M., PALACIOS, G., SUN, M. G., KUHN, J. H., BAVARI, S. & ZENG, X. 2018. Persistent Marburg Virus Infection in the Testes of Nonhuman Primate Survivors. *Cell Host Microbe*, 24, 405-416.e3.
- COLMAN, P. M. & LAWRENCE, M. C. 2003. The structural biology of type I viral membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 309-19.
- COSTES, S. V., DAELEMANS, D., CHO, E. H., DOBBIN, Z., PAVLAKIS, G. & LOCKETT, S. 2004. Automatic

- and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophys J*, 86, 3993-4003.
- COTE, M., MISASI, J., REN, T., BRUCHEZ, A., LEE, K., FILONE, C. M., HENSLEY, L., LI, Q., ORY, D., CHANDRAN, K. & CUNNINGHAM, J. 2011. Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for Ebola virus infection. *Nature*, 477, 344-8.
- CRAMM-BEHRENS, C. I., DIENST, M. & JACOB, R. 2008. Apical cargo traverses endosomal compartments on the passage to the cell surface. *Traffic*, 9, 2206-20.
- CRESAWN, K. O., POTTER, B. A., OZTAN, A., GUERRIERO, C. J., IHRKE, G., GOLDENRING, J. R., APODACA, G. & WEISZ, O. A. 2007. Differential involvement of endocytic compartments in the biosynthetic traffic of apical proteins. *Embo j*, 26, 3737-48.
- CURRAN, J. & KOLAKOSKY, D. 2008. Nonsegmented negative-strand RNA virus RNA synthesis in vivo. *Virology*. United States.
- DANIELS, R., KUROWSKI, B., JOHNSON, A. E. & HEBERT, D. N. 2003. N-linked glycans direct the cotranslational folding pathway of influenza hemagglutinin. *Mol Cell*, 11, 79-90.
- DAVEY, R. T., JR., DODD, L., PROSCHAN, M. A., NEATON, J., NEUHAUS NORDWALL, J., KOOPMEINERS, J. S., BEIGEL, J., TIERNEY, J., LANE, H. C., FAUCI, A. S., MASSAQUOI, M. B. F., SAHR, F. & MALVY, D. 2016. A Randomized, Controlled Trial of ZMapp for Ebola Virus Infection. *N Engl J Med*, 375, 1448-1456.
- DAVIDSON, E., BRYAN, C., FONG, R. H., BARNES, T., PFAFF, J. M., MABILA, M., RUCKER, J. B. & DORANZ, B. J. 2015. Mechanism of Binding to Ebola Virus Glycoprotein by the ZMapp, ZMAb, and MB-003 Cocktail Antibodies. *J Virol*, 89, 10982-92.
- DE SANTIS, O., AUDRAN, R., POTHIN, E., WARPELIN-DECAUSAZ, L., VALLOTTON, L., WUERZNER, G., COCHET, C., ESTOPPEY, D., STEINER-MONARD, V., LONCHAMPT, S., THIERRY, A. C., MAYOR, C., BAILER, R. T., MBAYA, O. T., ZHOU, Y., PLOQUIN, A., SULLIVAN, N. J., GRAHAM, B. S., ROMAN, F., DE RYCK, I., BALLOU, W. R., KIENY, M. P., MOORTHY, V., SPERTINI, F. & GENTON, B. 2016. Safety and immunogenicity of a chimpanzee adenovirus-vectored Ebola vaccine in healthy adults: a randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-finding, phase 1/2a study. *Lancet Infect Dis*, 16, 311-20.
- DE VRIES, M., HERRMANN, A. & VEIT, M. 2015. A cholesterol consensus motif is required for efficient intracellular transport and raft association of a group 2 HA from influenza virus. *Biochem J*, 465, 305-14.
- DELACOUR, D., CRAMM-BEHRENS, C. I., DROBECQ, H., LE BIVIC, A., NAIM, H. Y. & JACOB, R. 2006. Requirement for galectin-3 in apical protein sorting. *Curr Biol*, 16, 408-14.
- DELACOUR, D., GREB, C., KOCH, A., SALOMONSSON, E., LEFFLER, H., LE BIVIC, A. & JACOB, R. 2007. Apical sorting by galectin-3-dependent glycoprotein clustering. *Traffic*, 8, 379-88.
- DEMERS, A., RAN, Z., DENG, Q., WANG, D., EDMAN, B., LU, W. & LI, F. 2014. Palmitoylation is required for intracellular trafficking of influenza B virus NB protein and efficient influenza B virus growth in vitro. *J Gen Virol*, 95, 1211-20.
- DESCLOZEUX, M., VENTURATO, J., WYLIE, F. G., KAY, J. G., JOSEPH, S. R., LE, H. T. & STOW, J. L. 2008. Active Rab11 and functional recycling endosome are required for E-cadherin trafficking and lumen formation during epithelial morphogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 295, C545-56.
- DICARLO, A., BIEDENKOPF, N., HARTLIEB, B., KLUSSMEIER, A. & BECKER, S. 2011. Phosphorylation of Marburg virus NP region II modulates viral RNA synthesis. *J Infect Dis*, 204 Suppl 3, S927-33.
- DIEDERICH, S. & MAISNER, A. 2007. Molecular characteristics of the Nipah virus glycoproteins. *Ann N Y Acad Sci*, 1102, 39-50.
- DIEDERICH, S., SAUERHERING, L., WEIS, M., ALTMEPPEN, H., SCHASCHKE, N., REINHECKEL, T., ERBAR, S. & MAISNER, A. 2012. Activation of the Nipah virus fusion protein in MDCK cells is mediated by cathepsin B within the endosome-recycling compartment. *J Virol*, 86, 3736-45.
- DIETZEL, E., KOLESNIKOVA, L. & MAISNER, A. 2013. Actin filaments disruption and stabilization affect measles virus maturation by different mechanisms. *Virol J*, 10, 249.



- DOHNER, K., NAGEL, C. H. & SODEIK, B. 2005. Viral stop-and-go along microtubules: taking a ride with dynein and kinesins. *Trends Microbiol*, 13, 320-7.
- DOLNIK, O., KOLESNIKOVA, L. & BECKER, S. 2008. Filoviruses: Interactions with the host cell. *Cell Mol Life Sci*, 65, 756-76.
- DOLNIK, O., KOLESNIKOVA, L., STEVERMANN, L. & BECKER, S. 2010. Tsg101 is recruited by a late domain of the nucleocapsid protein to support budding of Marburg virus-like particles. *J Virol*, 84, 7847-56.
- DOLNIK, O., KOLESNIKOVA, L., WELSCH, S., STRECKER, T., SCHUDT, G. & BECKER, S. 2014. Interaction with Tsg101 is necessary for the efficient transport and release of nucleocapsids in marburg virus-infected cells. *PLoS Pathog*, 10, e1004463.
- DOLNIK, O., STEVERMANN, L., KOLESNIKOVA, L. & BECKER, S. 2015. Marburg virus inclusions: A virus-induced microcompartment and interface to multivesicular bodies and the late endosomal compartment. *Eur J Cell Biol*, 94, 323-31.
- DOMI, A., FELDMANN, F., BASU, R., MCCURLEY, N., SHIFFLETT, K., EMANUEL, J., HELLERSTEIN, M. S., GUIRAKHOO, F., ORLANDI, C., FLINKO, R., LEWIS, G. K., HANLEY, P. W., FELDMANN, H., ROBINSON, H. L. & MARZI, A. 2018. A Single Dose of Modified Vaccinia Ankara expressing Ebola Virus Like Particles Protects Nonhuman Primates from Lethal Ebola Virus Challenge. *Sci Rep*, 8, 864.
- DUNN, K. W., KAMOCKA, M. M. & MCDONALD, J. H. 2011. A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *Am J Physiol Cell Physiol*, 300, C723-42.
- EISFELD, A. J., KAWAKAMI, E., WATANABE, T., NEUMANN, G. & KAWAOKA, Y. 2011. RAB11A is essential for transport of the influenza virus genome to the plasma membrane. *J Virol*, 85, 6117-26.
- ELLIS, M. A., POTTER, B. A., CRESAWN, K. O. & WEISZ, O. A. 2006. Polarized biosynthetic traffic in renal epithelial cells: sorting, sorting, everywhere. *Am J Physiol Renal Physiol*, 291, F707-13.
- ENGEL, S., DE VRIES, M., HERRMANN, A. & VEIT, M. 2012. Mutation of a raft-targeting signal in the transmembrane region retards transport of influenza virus hemagglutinin through the Golgi. *FEBS Lett*, 586, 277-82.
- ENTERLEIN, S., VOLCHKOV, V., WEIK, M., KOLESNIKOVA, L., VOLCHKOVA, V., KLENK, H. D. & MUHLBERGER, E. 2006. Rescue of recombinant Marburg virus from cDNA is dependent on nucleocapsid protein VP30. *J Virol*, 80, 1038-43.
- ETOH, K. & FUKUDA, M. 2019. Rab10 regulates tubular endosome formation through KIF13A and KIF13B motors. *J Cell Sci*, 132.
- FAIRN, G. D., SCHIEBER, N. L., ARIOTTI, N., MURPHY, S., KUERSCHNER, L., WEBB, R. I., GRINSTEIN, S. & PARTON, R. G. 2011. High-resolution mapping reveals topologically distinct cellular pools of phosphatidylserine. *J Cell Biol*, 194, 257-75.
- FANTINI, J., DI SCALA, C., EVANS, L. S., WILLIAMSON, P. T. & BARRANTES, F. J. 2016. A mirror code for protein-cholesterol interactions in the two leaflets of biological membranes. *Sci Rep*, 6, 21907.
- FELDMANN, H., BUGANY, H., MAHNER, F., KLENK, H. D., DRENCKHAHN, D. & SCHNITTNER, H. J. 1996. Filovirus-induced endothelial leakage triggered by infected monocytes/macrophages. *J Virol*, 70, 2208-14.
- FELDMANN, H., MUHLBERGER, E., RANDOLF, A., WILL, C., KILEY, M. P., SANCHEZ, A. & KLENK, H. D. 1992. Marburg virus, a filovirus: messenger RNAs, gene order, and regulatory elements of the replication cycle. *Virus Res*, 24, 1-19.
- FELDMANN, H., VOLCHKOV, V. E., VOLCHKOVA, V. A. & KLENK, H. D. 1999. The glycoproteins of Marburg and Ebola virus and their potential roles in pathogenesis. *Arch Virol Suppl*, 15, 159-69.
- FELDMANN, H., WILL, C., SCHIKORE, M., SLENCZKA, W. & KLENK, H. D. 1991. Glycosylation and oligomerization of the spike protein of Marburg virus. *Virology*, 182, 353-6.
- FISH, K. N. 2009. Total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy. *Curr Protoc Cytom*, Chapter

- 12, Unit12.18.
- FOWLER, T., BAMBERG, S., MOLLER, P., KLENK, H. D., MEYER, T. F., BECKER, S. & RUDEL, T. 2005. Inhibition of Marburg virus protein expression and viral release by RNA interference. *J Gen Virol*, 86, 1181-8.
- FUKUDA, M. 2010. How can mammalian Rab small GTPases be comprehensively analyzed?: Development of new tools to comprehensively analyze mammalian Rabs in membrane traffic. *Histol Histopathol*, 25, 1473-80.
- FUNKE, C., BECKER, S., DARTSCH, H., KLENK, H. D. & MUHLBERGER, E. 1995. Acylation of the Marburg virus glycoprotein. *Virology*, 208, 289-97.
- FURUTA, Y., GOWEN, B. B., TAKAHASHI, K., SHIRAKI, K., SMEE, D. F. & BARNARD, D. L. 2013. Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor. *Antiviral Res*, 100, 446-54.
- FURUTA, Y., KOMENO, T. & NAKAMURA, T. 2017. Favipiravir (T-705), a broad spectrum inhibitor of viral RNA polymerase. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 93, 449-463.
- FUTTER, C. E., CONNOLLY, C. N., CUTLER, D. F. & HOPKINS, C. R. 1995. Newly synthesized transferrin receptors can be detected in the endosome before they appear on the cell surface. *J Biol Chem*, 270, 10999-1003.
- GAUDIN, R., DE ALENCAR, B. C., JOUVE, M., BERRE, S., LE BOUDER, E., SCHINDLER, M., VARTHAMAN, A., GOBERT, F. X. & BENAROCHE, P. 2012. Critical role for the kinesin KIF3A in the HIV life cycle in primary human macrophages. *J Cell Biol*, 199, 467-79.
- GEISBERT, T. W. & FELDMANN, H. 2011. Recombinant vesicular stomatitis virus-based vaccines against Ebola and Marburg virus infections. *J Infect Dis*, 204 Suppl 3, S1075-81.
- GEISBERT, T. W. & JAHRLING, P. B. 1995. Differentiation of filoviruses by electron microscopy. *Virus Res*, 39, 129-50.
- GEYER, H., WILL, C., FELDMANN, H., KLENK, H. D. & GEYER, R. 1992. Carbohydrate structure of Marburg virus glycoprotein. *Glycobiology*, 2, 299-312.
- GNIRß, K., FIEDLER, M., KRAMER-KUHL, A., BOLDUAN, S., MITTLER, E., BECKER, S., SCHINDLER, M. & POHLMANN, S. 2014. Analysis of determinants in filovirus glycoproteins required for tetherin antagonism. *Viruses*, 6, 1654-71.
- GNIRß, K., KUHL, A., KARSTEN, C., GLOWACKA, I., BERTRAM, S., KAUP, F., HOFMANN, H. & POHLMANN, S. 2012. Cathepsins B and L activate Ebola but not Marburg virus glycoproteins for efficient entry into cell lines and macrophages independent of Tmprss2 expression. *Virology*, 424, 3-10.
- GOLDENRING, J. R. 2015. Recycling endosomes. *Curr Opin Cell Biol*, 35, 117-22.
- GOLDSTEIN, T., ANTHONY, S. J., GBAKIMA, A., BIRD, B. H., BANGURA, J., TREMEAU-BRAVARD, A., BELAGANAHALLI, M. N., WELLS, H. L., DHANOTA, J. K., LIANG, E., GRODUS, M., JANGRA, R. K., DEJESUS, V. A., LASSO, G., SMITH, B. R., JAMBAL, A., KAMARA, B. O., KAMARA, S., BANGURA, W., MONAGIN, C., SHAPIRA, S., JOHNSON, C. K., SAYLORS, K., RUBIN, E. M., CHANDRAN, K., LIPKIN, W. I. & MAZET, J. A. K. 2018. The discovery of Bombali virus adds further support for bats as hosts of ebolaviruses. *Nat Microbiol*, 3, 1084-1089.
- GOMEZ-NAVARRO, N. & MILLER, E. 2016. Protein sorting at the ER-Golgi interface. *J Cell Biol*, 215, 769-778.
- GOMIS-RUTH, F. X., DESSEN, A., TIMMINS, J., BRACHER, A., KOLESNIKOWA, L., BECKER, S., KLENK, H. D. & WEISSENHORN, W. 2003. The matrix protein VP40 from Ebola virus octamerizes into pore-like structures with specific RNA binding properties. *Structure*, 11, 423-33.
- GONZALEZ, A. & RODRIGUEZ-BOULAN, E. 2009. Clathrin and AP1B: key roles in basolateral trafficking through trans-endosomal routes. *FEBS Lett*, 583, 3784-95.
- GRAMBERG, T., HOFMANN, H., MOLLER, P., LALOR, P. F., MARZI, A., GEIER, M., KRUMBIEGEL, M., WINKLER, T., KIRCHHOFF, F., ADAMS, D. H., BECKER, S., MUNCH, J. & POHLMANN, S. 2005. LSECtin interacts with filovirus glycoproteins and the spike protein of SARS coronavirus. *Virology*, 340, 224-36.
- GRANT-KLEIN, R. J., ALTAMURA, L. A., BADGER, C. V., BOUNDS, C. E., VAN DEUSEN, N. M., KWILAS, S.

- A., VU, H. A., WARFIELD, K. L., HOOPER, J. W., HANNAMAN, D., DUPUY, L. C. & SCHMALJOHN, C. S. 2015. Codon-optimized filovirus DNA vaccines delivered by intramuscular electroporation protect cynomolgus macaques from lethal Ebola and Marburg virus challenges. *Hum Vaccin Immunother*, 11, 1991-2004.
- HALES, C. M., VAERMAN, J. P. & GOLDENRING, J. R. 2002. Rab11 family interacting protein 2 associates with Myosin Vb and regulates plasma membrane recycling. *J Biol Chem*, 277, 50415-21.
- HALWE, S. 2012. *Charakterisierung des intrazellulären Transports des Marburgvirus Glykoproteins*. B.Sc., Philipps-University Marburg.
- HALWE, S. 2014. *Die Rolle von Rab-GTPasen im intrazellulären Transport des Marburgvirus Glykoproteins*. M.Sc., Philipps-University Marburg.
- HAMMER, J. A., 3RD & SELLERS, J. R. 2011. Walking to work: roles for class V myosins as cargo transporters. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13, 13-26.
- HAMMER, J. A., 3RD & WAGNER, W. 2013. Functions of class V myosins in neurons. *J Biol Chem*, 288, 28428-34.
- HARA-KUGE, S., SEKO, A., SHIMADA, O., TOSAKA-SHIMADA, H. & YAMASHITA, K. 2004. The binding of VIP36 and alpha-amylase in the secretory vesicles via high-mannose type glycans. *Glycobiology*, 14, 739-44.
- HARRISON, J. S., KOELLHOFFER, J. F., CHANDRAN, K. & LAI, J. R. 2012. Marburg virus glycoprotein GP2: pH-dependent stability of the ectodomain alpha-helical bundle. *Biochemistry*, 51, 2515-25.
- HASHIGUCHI, T., FUSCO, M. L., BORNHOLDT, Z. A., LEE, J. E., FLYAK, A. I., MATSUOKA, R., KOHDA, D., YANAGI, Y., HAMMEL, M., CROWE, J. E., JR. & SAPHIRE, E. O. 2015. Structural basis for Marburg virus neutralization by a cross-reactive human antibody. *Cell*, 160, 904-912.
- HATTULA, K., FURUHJELM, J., TIKKANEN, J., TANHUANPAA, K., LAAKKONEN, P. & PERANEN, J. 2006. Characterization of the Rab8-specific membrane traffic route linked to protrusion formation. *J Cell Sci*, 119, 4866-77.
- HENAO-RESTREPO, A. M., CAMACHO, A., LONGINI, I. M., WATSON, C. H., EDMUNDS, W. J., EGGER, M., CARROLL, M. W., DEAN, N. E., DIATTA, I., DOUMBIA, M., DRAGUEZ, B., DURAFFOUR, S., ENWERE, G., GRAIS, R., GUNTHER, S., GSELL, P. S., HOSSMANN, S., WATLE, S. V., KONDE, M. K., KEITA, S., KONE, S., KUISMA, E., LEVINE, M. M., MANDAL, S., MAUGET, T., NORHEIM, G., RIVEROS, X., SOUMAH, A., TRELLE, S., VICARI, A. S., ROTTINGEN, J. A. & KIENY, M. P. 2017. Efficacy and effectiveness of an rVSV-vectored vaccine in preventing Ebola virus disease: final results from the Guinea ring vaccination, open-label, cluster-randomised trial (Ebola Ca Suffit!). *Lancet*, 389, 505-518.
- HENAO-RESTREPO, A. M., LONGINI, I. M., EGGER, M., DEAN, N. E., EDMUNDS, W. J., CAMACHO, A., CARROLL, M. W., DOUMBIA, M., DRAGUEZ, B., DURAFFOUR, S., ENWERE, G., GRAIS, R., GUNTHER, S., HOSSMANN, S., KONDE, M. K., KONE, S., KUISMA, E., LEVINE, M. M., MANDAL, S., NORHEIM, G., RIVEROS, X., SOUMAH, A., TRELLE, S., VICARI, A. S., WATSON, C. H., KEITA, S., KIENY, M. P. & ROTTINGEN, J. A. 2015. Efficacy and effectiveness of an rVSV-vectored vaccine expressing Ebola surface glycoprotein: interim results from the Guinea ring vaccination cluster-randomised trial. *Lancet*, 386, 857-66.
- HENRY, L. & SHEFF, D. R. 2008. Rab8 regulates basolateral secretory, but not recycling, traffic at the recycling endosome. *Mol Biol Cell*, 19, 2059-68.
- HERKER, E. & OTT, M. 2012. Emerging role of lipid droplets in host/pathogen interactions. *J Biol Chem*, 287, 2280-7.
- HOENEN, T., JUNG, S., HERWIG, A., GROSETH, A. & BECKER, S. 2010. Both matrix proteins of Ebola virus contribute to the regulation of viral genome replication and transcription. *Virology*, 403, 56-66.
- HOENEN, T., SHABMAN, R. S., GROSETH, A., HERWIG, A., WEBER, M., SCHUDT, G., DOLNIK, O., BASLER, C. F., BECKER, S. & FELDMANN, H. 2012. Inclusion bodies are a site of ebolavirus

- replication. *J Virol*, 86, 11779-88.
- HOENEN, T., VOLCHKOV, V., KOLESNIKOVA, L., MITTLER, E., TIMMINS, J., OTTMANN, M., REYNARD, O., BECKER, S. & WEISSENHORN, W. 2005. VP40 octamers are essential for Ebola virus replication. *J Virol*, 79, 1898-905.
- HOFMANN-WINKLER, H., KAUP, F. & POHLMANN, S. 2012. Host cell factors in filovirus entry: novel players, new insights. *Viruses*, 4, 3336-62.
- HOLZER, M., KRAHLING, V., AMMAN, F., BARTH, E., BERNHART, S. H., CARMELO, V. A., COLLATZ, M., DOOSE, G., EGGENHOFER, F., EWALD, J., FALLMANN, J., FELDHAHN, L. M., FRICKE, M., GEBAUER, J., GRUBER, A. J., HUFSKY, F., INDRISCHEK, H., KANTON, S., LINDE, J., MOSTAJO, N., OCHSENREITER, R., RIEGE, K., RIVAROLA-DUARTE, L., SAHYOUN, A. H., SAUNDERS, S. J., SEEMANN, S. E., TANZER, A., VOGEL, B., WEHNER, S., WOLFINGER, M. T., BACKOFEN, R., GORODKIN, J., GROSSE, I., HOFACKER, I., HOFFMANN, S., KALETA, C., STADLER, P. F., BECKER, S. & MARZ, M. 2016. Differential transcriptional responses to Ebola and Marburg virus infection in bat and human cells. *Sci Rep*, 6, 34589.
- HUBER, L. A., PIMPLIKAR, S., PARTON, R. G., VIRTA, H., ZERIAL, M. & SIMONS, K. 1993. Rab8, a small GTPase involved in vesicular traffic between the TGN and the basolateral plasma membrane. *J Cell Biol*, 123, 35-45.
- HUMPHREYS, I. R. & SEBASTIAN, S. 2018. Novel viral vectors in infectious diseases. *Immunology*, 153, 1-9.
- HUNT, C. L., LENNEMANN, N. J. & MAURY, W. 2012. Filovirus entry: a novelty in the viral fusion world. *Viruses*, 4, 258-75.
- IHRKE, G., BRUNS, J. R., LUZIO, J. P. & WEISZ, O. A. 2001. Competing sorting signals guide endolyn along a novel route to lysosomes in MDCK cells. *Embo j*, 20, 6256-64.
- INOUE, T. & TSAI, B. 2013. How viruses use the endoplasmic reticulum for entry, replication, and assembly. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5, a013250.
- JACOB, R., ALFALAH, M., GRUNBERG, J., OBENDORF, M. & NAIM, H. Y. 2000. Structural determinants required for apical sorting of an intestinal brush-border membrane protein. *J Biol Chem*, 275, 6566-72.
- JACOBS, D. T., WEIGERT, R., GRODE, K. D., DONALDSON, J. G. & CHENEY, R. E. 2009. Myosin Vc is a molecular motor that functions in secretory granule trafficking. *Mol Biol Cell*, 20, 4471-88.
- JI, H. H., YAO, L. L., LIU, C. & LI, X. D. 2019. Regulation of Myosin-5b by Rab11a and the Rab11 family interacting protein 2. *Biosci Rep*, 39.
- JONES, S. M., FELDMANN, H., STROHER, U., GEISBERT, J. B., FERNANDO, L., GROLLA, A., KLENK, H. D., SULLIVAN, N. J., VOLCHKOV, V. E., FRITZ, E. A., DADDARIO, K. M., HENSLEY, L. E., JAHRLING, P. B. & GEISBERT, T. W. 2005. Live attenuated recombinant vaccine protects nonhuman primates against Ebola and Marburg viruses. *Nat Med*, 11, 786-90.
- JUNUTULA, J. R., DE MAZIERE, A. M., PEDEN, A. A., ERVIN, K. E., ADVANI, R. J., VAN DIJK, S. M., KLUMPERMAN, J. & SCHELLER, R. H. 2004. Rab14 is involved in membrane trafficking between the Golgi complex and endosomes. *Mol Biol Cell*, 15, 2218-29.
- KANERVA, K., URONEN, R. L., BLOM, T., LI, S., BITTMAN, R., LAPPALAINEN, P., PERANEN, J., RAPOSO, G. & IKONEN, E. 2013. LDL cholesterol recycles to the plasma membrane via a Rab8a-Myosin5b-actin-dependent membrane transport route. *Dev Cell*, 27, 249-62.
- KAPITEIN, L. C., VAN BERGEIJK, P., LIPKA, J., KEIJZER, N., WULF, P. S., KATRUKHA, E. A., AKHMANOVA, A. & HOOGENRAAD, C. C. 2013. Myosin-V opposes microtubule-based cargo transport and drives directional motility on cortical actin. *Curr Biol*, 23, 828-34.
- KATOH, H., NAKATSU, Y., KUBOTA, T., SAKATA, M., TAKEDA, M. & KIDOKORO, M. 2015. Mumps Virus Is Released from the Apical Surface of Polarized Epithelial Cells, and the Release Is Facilitated by a Rab11-Mediated Transport System. *J Virol*, 89, 12026-34.
- KELLY, E. E., HORGAN, C. P., ADAMS, C., PATZER, T. M., NI SHUILLEABHAIN, D. M., NORMAN, J. C. & MCCAFFREY, M. W. 2009. Class I Rab11-family interacting proteins are binding targets for the Rab14 GTPase. *Biol Cell*, 102, 51-62.

- KELLY, E. E., HORGAN, C. P. & MCCAFFREY, M. W. 2012. Rab11 proteins in health and disease. *Biochem Soc Trans*, 40, 1360-7.
- KERBER, R., LORENZ, E., DURAFFOUR, S., SISSOKO, D., RUDOLF, M., JAEGER, A., CISSE, S. D., CAMARA, A. M., MIRANDA, O., CASTRO, C. M., AKOI BORE, J., RAYMOND KOUNDOUNO, F., REPITS, J., AFROUGH, B., BECKER-ZIAJA, B., HINZMANN, J., MERTENS, M., VITORIANO, I., HUGH LOGUE, C., BOTTCHE, J. P., PALLASCH, E., SACHSE, A., BAH, A., CABEZA-CABRERIZO, M., NITZSCHE, K., KUISMA, E., MICHEL, J., HOLM, T., GAYLE ZEKENG, E., COWLEY, L. A., GARCIA-DORIVAL, I., HETZELT, N., JOSEF BAUM, J. H., PORTMANN, J., CARTER, L., YENAMABERHAN, R. L., CAMINO, A., ENKIRCH, T., SINGETHAN, K., MEISEL, S., MAZZARELLI, A., KOSGEI, A., KAFETZOPOULOU, L., RICKETT, N. Y., PATRONO, L. V., GHEBREGHIOGHIS, L., ARNOLD, U., COLIN, G., JUCHET, S., MARCHAL, C. L., KOLIE, J. S., BEAVOGUI, A. H., WURR, S., BOCKHOLT, S., KRUMKAMP, R., MAY, J., STOECKER, K., FLEISCHMANN, E., IPPOLITO, G., M. W. C., KOIVOGUI, L., MAGASSOUBA, N., KEITA, S., GURRY, C., DRURY, P., DIALLO, B., FORMENTY, P., WOLFEL, R., CARO, A. D., GABRIEL, M., ANGLARET, X., MALVY, D. & GUNTHER, S. 2019. Laboratory findings, compassionate use of favipiravir, and outcome in patients with Ebola virus disease, Guinea, 2015 - a retrospective observational study. *J Infect Dis*.
- KILEY, M. P., BOWEN, E. T., EDDY, G. A., ISAACSON, M., JOHNSON, K. M., MCCORMICK, J. B., MURPHY, F. A., PATTYN, S. R., PETERS, D., PROZESKY, O. W., REGNER, R. L., SIMPSON, D. I., SLENCZKA, W., SUREAU, P., VAN DER GROEN, G., WEBB, P. A. & WULFF, H. 1982. Filoviridae: a taxonomic home for Marburg and Ebola viruses? *Intervirology*, 18, 24-32.
- KILEY, M. P., COX, N. J., ELLIOTT, L. H., SANCHEZ, A., DEFRIES, R., BUCHMEIER, M. J., RICHMAN, D. D. & MCCORMICK, J. B. 1988. Physicochemical properties of Marburg virus: evidence for three distinct virus strains and their relationship to Ebola virus. *J Gen Virol*, 69 ( Pt 8), 1957-67.
- KIRSCHMAN, J., QI, M., DING, L., HAMMONDS, J., DIENGER-STAMBAUGH, K., WANG, J. J., LAPIERRE, L. A., GOLDENRING, J. R. & SPEARMAN, P. 2018. HIV-1 Envelope Glycoprotein Trafficking through the Endosomal Recycling Compartment Is Required for Particle Incorporation. *J Virol*, 92.
- KITT, K. N., HERNANDEZ-DEVIEZ, D., BALLANTYNE, S. D., SPILIOTIS, E. T., CASANOVA, J. E. & WILSON, J. M. 2008. Rab14 regulates apical targeting in polarized epithelial cells. *Traffic*, 9, 1218-31.
- KLAUS, J. P., EISENHAEUER, P., RUSSO, J., MASON, A. B., DO, D., KING, B., TAATJES, D., CORNILLEZ-TY, C., BOYSON, J. E., THALI, M., ZHENG, C., LIAO, L., YATES, J. R., 3RD, ZHANG, B., BALLIF, B. A. & BOTTEN, J. W. 2013. The intracellular cargo receptor ERGIC-53 is required for the production of infectious arenavirus, coronavirus, and filovirus particles. *Cell Host Microbe*, 14, 522-34.
- KNODLER, A., FENG, S., ZHANG, J., ZHANG, X., DAS, A., PERANEN, J. & GUO, W. 2010. Coordination of Rab8 and Rab11 in primary ciliogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 6346-51.
- KOBAYASHI, H. & FUKUDA, M. 2013. Arf6, Rab11 and transferrin receptor define distinct populations of recycling endosomes. *Commun Integr Biol*, 6, e25036.
- KOBAYASHI, S., SUZUKI, T., KAWAGUCHI, A., PHONGPHAWE, W., YOSHII, K., IWANO, T., HARADA, A., KARIWA, H., ORBA, Y. & SAWA, H. 2016. Rab8b Regulates Transport of West Nile Virus Particles from Recycling Endosomes. *J Biol Chem*, 291, 6559-68.
- KOEHLER, A., KOLESNIKOVA, L. & BECKER, S. 2016a. An active site mutation increases the polymerase activity of the guinea pig-lethal Marburg virus. *J Gen Virol*, 97, 2494-2500.
- KOEHLER, A., KOLESNIKOVA, L., WELZEL, U., SCHUDT, G., HERWIG, A. & BECKER, S. 2016b. A Single Amino Acid Change in the Marburg Virus Matrix Protein VP40 Provides a Replicative Advantage in a Species-Specific Manner. *J Virol*, 90, 1444-54.
- KOELLHOFFER, J. F., MALASHKEVICH, V. N., HARRISON, J. S., TORO, R., BHOSLE, R. C., CHANDRAN, K., ALMO, S. C. & LAI, J. R. 2012. Crystal structure of the Marburg virus GP2 core domain in its postfusion conformation. *Biochemistry*, 51, 7665-75.
- KOLESNIKOVA, L., BAMBERG, S., BERGHOFER, B. & BECKER, S. 2004a. The matrix protein of Marburg virus is transported to the plasma membrane along cellular membranes: exploiting the retrograde late endosomal pathway. *J Virol*, 78, 2382-93.



- KOLESNIKOVA, L., BERGHOFER, B., BAMBERG, S. & BECKER, S. 2004b. Multivesicular bodies as a platform for formation of the Marburg virus envelope. *J Virol*, 78, 12277-87.
- KOLESNIKOVA, L., BOHIL, A. B., CHENEY, R. E. & BECKER, S. 2007a. Budding of Marburgvirus is associated with filopodia. *Cell Microbiol*, 9, 939-51.
- KOLESNIKOVA, L., BUGANY, H., KLENK, H. D. & BECKER, S. 2002. VP40, the matrix protein of Marburg virus, is associated with membranes of the late endosomal compartment. *J Virol*, 76, 1825-38.
- KOLESNIKOVA, L., MITTLER, E., SCHUDT, G., SHAMS-ELDIN, H. & BECKER, S. 2012. Phosphorylation of Marburg virus matrix protein VP40 triggers assembly of nucleocapsids with the viral envelope at the plasma membrane. *Cell Microbiol*, 14, 182-97.
- KOLESNIKOVA, L., MUHLBERGER, E., RYABCHIKOVA, E. & BECKER, S. 2000. Ultrastructural organization of recombinant Marburg virus nucleoprotein: comparison with Marburg virus inclusions. *J Virol*, 74, 3899-904.
- KOLESNIKOVA, L., NANBO, A., BECKER, S. & KAWAOKA, Y. 2017. Inside the Cell: Assembly of Filoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol*, 411, 353-380.
- KOLESNIKOVA, L., RYABCHIKOVA, E., SHESTOPALOV, A. & BECKER, S. 2007b. Basolateral budding of Marburg virus: VP40 retargets viral glycoprotein GP to the basolateral surface. *J Infect Dis*, 196 Suppl 2, S232-6.
- KOLESNIKOVA, L., STRECKER, T., MORITA, E., ZIELECKI, F., MITTLER, E., CRUMP, C. & BECKER, S. 2009. Vacuolar protein sorting pathway contributes to the release of Marburg virus. *J Virol*, 83, 2327-37.
- KONDRATOWICZ, A. S., LENNEMANN, N. J., SINN, P. L., DAVEY, R. A., HUNT, C. L., MOLLER-TANK, S., MEYERHOLZ, D. K., RENNERT, P., MULLINS, R. F., BRINDLEY, M., SANDERSFELD, L. M., QUINN, K., WELLER, M., MCCRAY, P. B., JR., CHIORINI, J. & MAURY, W. 2011. T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 (TIM-1) is a receptor for Zaire Ebolavirus and Lake Victoria Marburgvirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 8426-31.
- KUHN, J. H. 2008. Filoviruses. A compendium of 40 years of epidemiological, clinical, and laboratory studies. *Arch Virol Suppl*, 20, 13-360.
- KUHN, J. H., RADOSHITZKY, S. R., GUTH, A. C., WARFIELD, K. L., LI, W., VINCENT, M. J., TOWNER, J. S., NICHOL, S. T., BAVARI, S., CHOE, H., AMAN, M. J. & FARZAN, M. 2006. Conserved receptor-binding domains of Lake Victoria marburgvirus and Zaire ebolavirus bind a common receptor. *J Biol Chem*, 281, 15951-8.
- LAD, V. J., SHENDE, V. R., GUPTA, A. K., KOSHY, A. A. & ROY, A. 2000. Effect of tunicamycin on expression of epitopes on Japanese encephalitis virus glycoprotein E in porcine kidney cells. *Acta Virol*, 44, 359-64.
- LAFONT, F., BURKHARDT, J. K. & SIMONS, K. 1994. Involvement of microtubule motors in basolateral and apical transport in kidney cells. *Nature*, 372, 801-3.
- LAJOIE, P., GOETZ, J. G., DENNIS, J. W. & NABI, I. R. 2009. Lattices, rafts, and scaffolds: domain regulation of receptor signaling at the plasma membrane. *J Cell Biol*, 185, 381-5.
- LAND, A. & BRAAKMAN, I. 2001. Folding of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein in the endoplasmic reticulum. *Biochimie*, 83, 783-90.
- LAPIERRE, L. A. & GOLDENRING, J. R. 2005. Interactions of myosin vb with rab11 family members and cargoes traversing the plasma membrane recycling system. *Methods Enzymol*, 403, 715-23.
- LAPIERRE, L. A., KUMAR, R., HALES, C. M., NAVARRE, J., BHARTUR, S. G., BURNETTE, J. O., PROVANCE, D. W., JR., MERCER, J. A., BAHLE, M. & GOLDENRING, J. R. 2001. Myosin vb is associated with plasma membrane recycling systems. *Mol Biol Cell*, 12, 1843-57.
- LAZAROVITS, J., NAIM, H. Y., RODRIGUEZ, A. C., WANG, R. H., FIRE, E., BIRD, C., HENIS, Y. I. & ROTH, M. G. 1996. Endocytosis of chimeric influenza virus hemagglutinin proteins that lack a cytoplasmic recognition feature for coated pits. *J Cell Biol*, 134, 339-48.
- LEBLANC, J. J., PEREZ, O. & HOPE, T. J. 2008. Probing the structural states of human immunodeficiency virus type 1 pr55gag by using monoclonal antibodies. *J Virol*, 82, 2570-4.



- LEE, J. E., FUSCO, M. L., HESSELL, A. J., OSWALD, W. B., BURTON, D. R. & SAPHIRE, E. O. 2008. Structure of the Ebola virus glycoprotein bound to an antibody from a human survivor. *Nature*, 454, 177-82.
- LEE, S., UCHIDA, Y., WANG, J., MATSUDAIRA, T., NAKAGAWA, T., KISHIMOTO, T., MUKAI, K., INABA, T., KOBAYASHI, T., MOLDAI, R. S., TAGUCHI, T. & ARAI, H. 2015. Transport through recycling endosomes requires EHD1 recruitment by a phosphatidylserine translocase. *Embo j*, 34, 669-88.
- LENNEMANN, N. J., WALKNER, M., BERKEBILE, A. R., PATEL, N. & MAURY, W. 2015. The Role of Conserved N-Linked Glycans on Ebola Virus Glycoprotein 2. *J Infect Dis*, 212 Suppl 2, S204-9.
- LEROY, E. M., KUMULUNGUI, B., POURRUT, X., ROUQUET, P., HASSANIN, A., YABA, P., DELICAT, A., PAWESKA, J. T., GONZALEZ, J. P. & SWANEPOEL, R. 2005. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature*, 438, 575-6.
- LI, H. & PAPADOPOULOS, V. 1998. Peripheral-type benzodiazepine receptor function in cholesterol transport. Identification of a putative cholesterol recognition/interaction amino acid sequence and consensus pattern. *Endocrinology*, 139, 4991-7.
- LIER, C., BECKER, S. & BIEDENKOPF, N. 2017. Dynamic phosphorylation of Ebola virus VP30 in NP-induced inclusion bodies. *Virology*, 512, 39-47.
- LIN, S., NAIM, H. Y., RODRIGUEZ, A. C. & ROTH, M. G. 1998. Mutations in the middle of the transmembrane domain reverse the polarity of transport of the influenza virus hemagglutinin in MDCK epithelial cells. *J Cell Biol*, 142, 51-7.
- LINDSAY, A. J., JOLLIVET, F., HORGAN, C. P., KHAN, A. R., RAPOSO, G., MCCAFFREY, M. W. & GOUD, B. 2013. Identification and characterization of multiple novel Rab-myosin Va interactions. *Mol Biol Cell*, 24, 3420-34.
- LIU, B., DONG, S., LI, G., WANG, W., LIU, X., WANG, Y., YANG, C., RAO, Z. & GUO, Y. 2017. Structural Insight into Nucleoprotein Conformation Change Chaperoned by VP35 Peptide in Marburg Virus. *J Virol*, 91.
- LOCK, J. G. & STOW, J. L. 2005. Rab11 in recycling endosomes regulates the sorting and basolateral transport of E-cadherin. *Mol Biol Cell*, 16, 1744-55.
- LOGUE, J., VARGAS LICONA, W., COOPER, T. K., REEDER, B., BYRUM, R., QIN, J., DEIULIIS MURPHY, N., CONG, Y., BONILLA, A., SWORD, J., WEAVER, W., KOCHER, G., OLINGER, G. G., JAHRLING, P. B., HENSLEY, L. E. & BENNETT, R. S. 2019. Ebola Virus Isolation Using Huh-7 Cells has Methodological Advantages and Similar Sensitivity to Isolation Using Other Cell Types and Suckling BALB/c Laboratory Mice. *Viruses*, 11.
- LOMBARDI, D., SOLDATI, T., RIEDERER, M. A., GODA, Y., ZERIAL, M. & PFEFFER, S. R. 1993. Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network. *Embo j*, 12, 677-82.
- LONTOK, E., CORSE, E. & MACHAMER, C. E. 2004. Intracellular targeting signals contribute to localization of coronavirus spike proteins near the virus assembly site. *J Virol*, 78, 5913-22.
- LOPEZ, L. A., YANG, S. J., EXLINE, C. M., RENGARAJAN, S., HAWORTH, K. G. & CANNON, P. M. 2012. Anti-tetherin activities of HIV-1 Vpu and Ebola virus glycoprotein do not involve removal of tetherin from lipid rafts. *J Virol*, 86, 5467-80.
- LU, X., MEHTA, A., DADMARZ, M., DWEK, R., BLUMBERG, B. S. & BLOCK, T. M. 1997a. Aberrant trafficking of hepatitis B virus glycoproteins in cells in which N-glycan processing is inhibited. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 2380-5.
- LU, X., MEHTA, A., DADMARZ, M., DWEK, R., BLUMBERG, B. S. & BLOCK, T. M. 1997b. Aberrant trafficking of hepatitis B virus glycoproteins in cells in which N-glycan processing is inhibited. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 2380-5.
- LUZIO, J. P., PRYOR, P. R. & BRIGHT, N. A. 2007. Lysosomes: fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 622-32.
- MACHESKY, L. 2019a. Rab11FIP proteins link endocytic recycling vesicles for cytoskeletal transport and tethering. *Biosci Rep*, 39.

- MACHESKY, L. M. 2019b. Rab11FIP proteins link endocytic recycling vesicles for cytoskeletal transport and tethering. *Biosci Rep*, 39.
- MAES, P., AMARASINGHE, G. K., AYLON, M. A., BASLER, C. F., BAVARI, S., BLASDELL, K. R., BRIESE, T., BROWN, P. A., BUKREYEV, A., BALKEMA-BUSCHMANN, A., BUCHHOLZ, U. J., CHANDRAN, K., CROZIER, I., DE SWART, R. L., DIETZGEN, R. G., DOLNIK, O., DOMIER, L. L., DREXLER, J. F., DURRWALD, R., DUNDON, W. G., DUPREX, W. P., DYE, J. M., EASTON, A. J., FOOKS, A. R., FORMENTY, P. B. H., FOUCHIER, R. A. M., FREITAS-ASTUA, J., GHEDIN, E., GRIFFITHS, A., HEWSON, R., HORIE, M., HURWITZ, J. L., HYNDMAN, T. H., JIANG, D., KOBINGER, G. P., KONDO, H., KURATH, G., KUZMIN, I. V., LAMB, R. A., LEE, B., LEROY, E. M., LI, J., MARZANO, S. L., MUHLBERGER, E., NETESOV, S. V., NOWOTNY, N., PALACIOS, G., PALYI, B., PAWESKA, J. T., PAYNE, S. L., RIMA, B. K., ROTA, P., RUBBENSTROTH, D., SIMMONDS, P., SMITHER, S. J., SONG, Q., SONG, T., SPANN, K., STENGLEIN, M. D., STONE, D. M., TAKADA, A., TESH, R. B., TOMONAGA, K., TORDO, N., TOWNER, J. S., VAN DEN HOOGEN, B., VASILAKIS, N., WAHL, V., WALKER, P. J., WANG, D., WANG, L. F., WHITFIELD, A. E., WILLIAMS, J. V., YE, G., ZERBINI, F. M., ZHANG, Y. Z. & KUHN, J. H. 2019. Taxonomy of the order Mononegavirales: second update 2018. *Arch Virol*.
- MANGUVO, A. & MAFUVADZE, B. 2015. The impact of traditional and religious practices on the spread of Ebola in West Africa: time for a strategic shift. *Pan Afr Med J*, 22 Suppl 1, 9.
- MANICASSAMY, B., WANG, J., RUMSCHLAG, E., TYMEN, S., VOLCHKOVA, V., VOLCHKOV, V. & RONG, L. 2007. Characterization of Marburg virus glycoprotein in viral entry. *Virology*, 358, 79-88.
- MARTINEZ, M. J., VOLCHKOVA, V. A., RAOUL, H., ALAZARD-DANY, N., REYNARD, O. & VOLCHKOV, V. E. 2011. Role of VP30 phosphorylation in the Ebola virus replication cycle. *J Infect Dis*, 204 Suppl 3, S934-40.
- MARTINEZ, N. W., XUE, X., BERRO, R. G., KREITZER, G. & RESH, M. D. 2008. Kinesin KIF4 regulates intracellular trafficking and stability of the human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein. *J Virol*, 82, 9937-50.
- MARTINI, G. A. & MEDIZINISCHE UNIVERSITÄTSKLINIK, M. L., GERMANY 1969. Marburg agent disease: In man. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 63, 295-302.
- MARTINI, G. A. & SCHMIDT, H. A. 1968. Spermatogene Übertragung des „Virus Marburg“. *Klinische Wochenschrift*, 46, 398-400.
- MARZI, A., FELDMANN, H., GEISBERT, T. W. & FALZARANO, D. 2011. Vesicular Stomatitis Virus-Based Vaccines for Prophylaxis and Treatment of Filovirus Infections. *J Bioterror Biodef*, S1.
- MARZI, A., GRAMBERG, T., SIMMONS, G., MOLLER, P., RENNEKAMP, A. J., KRUMBIEGEL, M., GEIER, M., EISEMANN, J., TURZA, N., SAUNIER, B., STEINKASSERER, A., BECKER, S., BATES, P., HOFMANN, H. & POHLMANN, S. 2004. DC-SIGN and DC-SIGNR interact with the glycoprotein of Marburg virus and the S protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol*, 78, 12090-5.
- MARZI, A., HANLEY, P. W., HADDOCK, E., MARTELLARO, C., KOBINGER, G. & FELDMANN, H. 2016. Efficacy of Vesicular Stomatitis Virus-Ebola Virus Postexposure Treatment in Rhesus Macaques Infected With Ebola Virus Makona. *J Infect Dis*, 214, S360-s366.
- MARZI, A., MENICUCCI, A. R., ENGELMANN, F., CALLISON, J., HORNE, E. J., FELDMANN, F., JANKEEL, A., FELDMANN, H. & MESSAOUDI, I. 2018. Protection Against Marburg Virus Using a Recombinant VSV-Vaccine Depends on T and B Cell Activation. *Front Immunol*, 9, 3071.
- MATTILA, P. E., KINLOUGH, C. L., BRUNS, J. R., WEISZ, O. A. & HUGHEY, R. P. 2009. MUC1 traverses apical recycling endosomes along the biosynthetic pathway in polarized MDCK cells. *Biol Chem*, 390, 551-6.
- MATTILA, P. E., YOUKER, R. T., MO, D., BRUNS, J. R., CRESAWN, K. O., HUGHEY, R. P., IHRKE, G. & WEISZ, O. A. 2012. Multiple biosynthetic trafficking routes for apically secreted proteins in MDCK cells. *Traffic*, 13, 433-42.
- MAYLE, K. M., LE, A. M. & KAMEI, D. T. 2012. The intracellular trafficking pathway of transferrin.

- Biochim Biophys Acta*, 1820, 264-81.
- MCCONNELL, G., AMOS, W. & WILSON, T. 2011. Confocal microscopy. *Handbook of Comprehensive Biophysics*.
- MEHEDI, M., FALZARANO, D., SEEBACH, J., HU, X., CARPENTER, M. S., SCHNITTLER, H. J. & FELDMANN, H. 2011a. A new Ebola virus nonstructural glycoprotein expressed through RNA editing. *J Virol*, 85, 5406-14.
- MEHEDI, M., GROSETH, A., FELDMANN, H. & EBIHARA, H. 2011b. Clinical aspects of Marburg hemorrhagic fever. *Future Virol*, 6, 1091-106.
- MELLMAN, I., YAMAMOTO, E., WHITNEY, J. A., KIM, M., HUNZIKER, W. & MATTER, K. 1993. Molecular sorting in polarized and non-polarized cells: common problems, common solutions. *J Cell Sci Suppl*, 17, 1-7.
- MERCER, J. A., SEPERACK, P. K., STROBEL, M. C., COPELAND, N. G. & JENKINS, N. A. 1991. Novel myosin heavy chain encoded by murine dilute coat colour locus. *Nature*, 349, 709-13.
- MERESSE, S., GORVEL, J. P. & CHAVRIER, P. 1995. The rab7 GTPase resides on a vesicular compartment connected to lysosomes. *J Cell Sci*, 108 ( Pt 11), 3349-58.
- MEUNIER, J. C., FOURNILLIER, A., CHOUKHI, A., CAHOUR, A., COCQUEREL, L., DUBUISSON, J. & WYCHOWSKI, C. 1999. Analysis of the glycosylation sites of hepatitis C virus (HCV) glycoprotein E1 and the influence of E1 glycans on the formation of the HCV glycoprotein complex. *J Gen Virol*, 80 ( Pt 4), 887-96.
- MILLER, E. H., OBERNOSTERER, G., RAABEN, M., HERBERT, A. S., DEFFIEU, M. S., KRISHNAN, A., NDUNGO, E., SANDESARA, R. G., CARETTE, J. E., KUEHNE, A. I., RUTHEL, G., PFEFFER, S. R., DYE, J. M., WHELAN, S. P., BRUMMELKAMP, T. R. & CHANDRAN, K. 2012. Ebola virus entry requires the host-programmed recognition of an intracellular receptor. *Embo j*, 31, 1947-60.
- MILLIGAN, I. D., GIBANI, M. M., SEWELL, R., CLUTTERBUCK, E. A., CAMPBELL, D., PLESTED, E., NUTHALL, E., VOYSEY, M., SILVA-REYES, L., MCEL RATH, M. J., DE ROSA, S. C., FRAHM, N., COHEN, K. W., SHUKAREV, G., ORZABAL, N., VAN DUIJNHOFEN, W., TRUYERS, C., BACHMAYER, N., SPLINTER, D., SAMY, N., PAU, M. G., SCHUITEMAKER, H., LUHN, K., CALLENDRET, B., VAN HOOFF, J., DOUGUIH, M., EWER, K., ANGUS, B., POLLARD, A. J. & SNAPE, M. D. 2016. Safety and Immunogenicity of Novel Adenovirus Type 26- and Modified Vaccinia Ankara-Vectored Ebola Vaccines: A Randomized Clinical Trial. *Jama*, 315, 1610-23.
- MIRE, C. E., GEISBERT, T. W., FELDMANN, H. & MARZI, A. 2016. Ebola virus vaccines - reality or fiction? *Expert Rev Vaccines*, 15, 1421-1430.
- MIRE, C. E., MILLER, A. D., CARVILLE, A., WESTMORELAND, S. V., GEISBERT, J. B., MANSFIELD, K. G., FELDMANN, H., HENSLEY, L. E. & GEISBERT, T. W. 2012. Recombinant vesicular stomatitis virus vaccine vectors expressing filovirus glycoproteins lack neurovirulence in nonhuman primates. *PLoS Negl Trop Dis*, 6, e1567.
- MISASI, J., CHANDRAN, K., YANG, J. Y., CONSIDINE, B., FILONE, C. M., COTE, M., SULLIVAN, N., FABOZZI, G., HENSLEY, L. & CUNNINGHAM, J. 2012. Filoviruses require endosomal cysteine proteases for entry but exhibit distinct protease preferences. *J Virol*, 86, 3284-92.
- MITTLER, E. 2009. *Funktionelle Charakterisierung der cytoplasmatischen Domäne des Marburgvirus-Oberflächenproteins GP*. Ph.D., Philipps-University Marburg.
- MITTLER, E., KOLESNIKOVA, L., HARTLIEB, B., DAVEY, R. & BECKER, S. 2011. The cytoplasmic domain of Marburg virus GP modulates early steps of viral infection. *J Virol*, 85, 8188-96.
- MITTLER, E., KOLESNIKOVA, L., HERWIG, A., DOLNIK, O. & BECKER, S. 2013. Assembly of the Marburg virus envelope. *Cell Microbiol*, 15, 270-84.
- MITTLER, E., KOLESNIKOVA, L., STRECKER, T., GARTEN, W. & BECKER, S. 2007. Role of the transmembrane domain of marburg virus surface protein GP in assembly of the viral envelope. *J Virol*, 81, 3942-8.
- MITTLER, E., SCHUDT, G., HALWE, S., ROHDE, C. & BECKER, S. 2018. A Fluorescently Labeled Marburg Virus Glycoprotein as a New Tool to Study Viral Transport and Assembly. *J Infect Dis*, 218, S318-S326.

- MODROF, J., MORITZ, C., KOLESNIKOVA, L., KONAKOVA, T., HARTLIEB, B., RANDOLF, A., MUHLBERGER, E. & BECKER, S. 2001. Phosphorylation of Marburg virus VP30 at serines 40 and 42 is critical for its interaction with NP inclusions. *Virology*, 287, 171-82.
- MOLL, M., KLENK, H. D., HERRLER, G. & MAISNER, A. 2001. A single amino acid change in the cytoplasmic domains of measles virus glycoproteins H and F alters targeting, endocytosis, and cell fusion in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem*, 276, 17887-94.
- MOLLENHAUER, H. H., MORRE, D. J. & ROWE, L. D. 1990. Alteration of intracellular traffic by monensin; mechanism, specificity and relationship to toxicity. *Biochim Biophys Acta*, 1031, 225-46.
- MOLLER, P., PARIENTE, N., KLENK, H. D. & BECKER, S. 2005. Homo-oligomerization of Marburgvirus VP35 is essential for its function in replication and transcription. *J Virol*, 79, 14876-86.
- MOMOSE, F., KIKUCHI, Y., KOMASE, K. & MORIKAWA, Y. 2007. Visualization of microtubule-mediated transport of influenza viral progeny ribonucleoprotein. *Microbes Infect*, 9, 1422-33.
- MOMOSE, F., SEKIMOTO, T., OHKURA, T., JO, S., KAWAGUCHI, A., NAGATA, K. & MORIKAWA, Y. 2011. Apical transport of influenza A virus ribonucleoprotein requires Rab11-positive recycling endosome. *PLoS One*, 6, e21123.
- MUHLBERGER, E. 2007. Filovirus replication and transcription. *Future Virol*, 2, 205-215.
- MUHLBERGER, E., LOTFERING, B., KLENK, H. D. & BECKER, S. 1998. Three of the four nucleocapsid proteins of Marburg virus, NP, VP35, and L, are sufficient to mediate replication and transcription of Marburg virus-specific monocistronic minigenomes. *J Virol*, 72, 8756-64.
- MUHLBERGER, E., SANCHEZ, A., RANDOLF, A., WILL, C., KILEY, M. P., KLENK, H. D. & FELDMANN, H. 1992. The nucleotide sequence of the L gene of Marburg virus, a filovirus: homologies with paramyxoviruses and rhabdoviruses. *Virology*, 187, 534-47.
- MUHLBERGER, E., TROMMER, S., FUNKE, C., VOLCHKOV, V., KLENK, H. D. & BECKER, S. 1996. Termini of all mRNA species of Marburg virus: sequence and secondary structure. *Virology*, 223, 376-80.
- MUHLBERGER, E., WEIK, M., VOLCHKOV, V. E., KLENK, H. D. & BECKER, S. 1999. Comparison of the transcription and replication strategies of marburg virus and Ebola virus by using artificial replication systems. *J Virol*, 73, 2333-42.
- MUSCH, A., XU, H., SHIELDS, D. & RODRIGUEZ-BOULAN, E. 1996. Transport of vesicular stomatitis virus G protein to the cell surface is signal mediated in polarized and nonpolarized cells. *J Cell Biol*, 133, 543-58.
- NACHMIAS, D., SKLAN, E. H., EHRLICH, M. & BACHARACH, E. 2012. Human immunodeficiency virus type 1 envelope proteins traffic toward virion assembly sites via a TBC1D20/Rab1-regulated pathway. *Retrovirology*, 9, 7.
- NAGHAVI, M. H., GUNDERSEN, G. G. & WALSH, D. 2013. Plus-end tracking proteins, CLASPs, and a viral Akt mimic regulate herpesvirus-induced stable microtubule formation and virus spread. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 18268-73.
- NAGHAVI, M. H. & WALSH, D. 2017. Microtubule Regulation and Function during Virus Infection. *J Virol*, 91.
- NAKATSU, Y., MA, X., SEKI, F., SUZUKI, T., IWASAKI, M., YANAGI, Y., KOMASE, K. & TAKEDA, M. 2013. Intracellular transport of the measles virus ribonucleoprotein complex is mediated by Rab11A-positive recycling endosomes and drives virus release from the apical membrane of polarized epithelial cells. *J Virol*, 87, 4683-93.
- NANBO, A., IMAI, M., WATANABE, S., NODA, T., TAKAHASHI, K., NEUMANN, G., HALFMANN, P. & KAWAOKA, Y. 2010. Ebolavirus is internalized into host cells via macropinocytosis in a viral glycoprotein-dependent manner. *PLoS Pathog*, 6, e1001121.
- NANBO, A. & OHBA, Y. 2018. Budding of Ebola Virus Particles Requires the Rab11-Dependent Endocytic Recycling Pathway. *J Infect Dis*, 218, S388-s396.
- NASLAVSKY, N. & CAPLAN, S. 2011. EHD proteins: key conductors of endocytic transport. *Trends Cell*

- Biol*, 21, 122-31.
- NEGREDO, A., PALACIOS, G., VAZQUEZ-MORON, S., GONZALEZ, F., DOPAZO, H., MOLERO, F., JUSTE, J., QUETGLAS, J., SAVJI, N., DE LA CRUZ MARTINEZ, M., HERRERA, J. E., PIZARRO, M., HUTCHISON, S. K., ECHEVARRIA, J. E., LIPKIN, W. I. & TENORIO, A. 2011. Discovery of an ebolavirus-like filovirus in europe. *PLoS Pathog*, 7, e1002304.
- NIKIFOROV, V. V., TUROVSKII IU, I., KALININ, P. P., AKINFEEVA, L. A., KATKOVA, L. R., BARMIN, V. S., RIABCHIKOVA, E. I., POPKOVA, N. I., SHESTOPALOV, A. M., NAZAROV, V. P. & ET AL. 1994. [A case of a laboratory infection with Marburg fever]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, 104-6.
- NISHI, M., RYO, A., TSURUTANI, N., OHBA, K., SAWASAKI, T., MORISHITA, R., PERREM, K., AOKI, I., MORIKAWA, Y. & YAMAMOTO, N. 2009. Requirement for microtubule integrity in the SOCS1-mediated intracellular dynamics of HIV-1 Gag. *FEBS Lett*, 583, 1243-50.
- NODA, T., SAGARA, H., SUZUKI, E., TAKADA, A., KIDA, H. & KAWAOKA, Y. 2002a. Ebola virus VP40 drives the formation of virus-like filamentous particles along with GP. *J Virol*, 76, 4855-65.
- NODA, T., SAGARA, H., SUZUKI, E., TAKADA, A., KIDA, H. & KAWAOKA, Y. 2002b. Ebola virus VP40 drives the formation of virus-like filamentous particles along with GP. *J Virol*, 76, 4855-65.
- NOKES, R. L., FIELDS, I. C., COLLINS, R. N. & FOLSCH, H. 2008. Rab13 regulates membrane trafficking between TGN and recycling endosomes in polarized epithelial cells. *J Cell Biol*, 182, 845-53.
- ODA, S., NODA, T., WIJESINGHE, K. J., HALFMANN, P., BORNHOLDT, Z. A., ABELSON, D. M., ARMBRUST, T., STAHELIN, R. V., KAWAOKA, Y. & SAPHIRE, E. O. 2016. Crystal Structure of Marburg Virus VP40 Reveals a Broad, Basic Patch for Matrix Assembly and a Requirement of the N-Terminal Domain for Immunosuppression. *J Virol*, 90, 1839-48.
- OLLION, J., COCHENNEC, J., LOLL, F., ESCUDE, C. & BOUDIER, T. 2013. TANGO: a generic tool for high-throughput 3D image analysis for studying nuclear organization. *Bioinformatics*, 29, 1840-1.
- PARK, S. J., KUMAR, M., KWON, H. I., SEONG, R. K., HAN, K., SONG, J. M., KIM, C. J., CHOI, Y. K. & SHIN, O. S. 2015. Dynamic changes in host gene expression associated with H5N8 avian influenza virus infection in mice. *Sci Rep*, 5, 16512.
- PEPPERKOK, R., LOWE, M., BURKE, B. & KREIS, T. E. 1998. Three distinct steps in transport of vesicular stomatitis virus glycoprotein from the ER to the cell surface in vivo with differential sensitivities to GTP gamma S. *J Cell Sci*, 111 ( Pt 13), 1877-88.
- PERANEN, J., AUVINEN, P., VIRTÄ, H., WEPF, R. & SIMONS, K. 1996. Rab8 promotes polarized membrane transport through reorganization of actin and microtubules in fibroblasts. *J Cell Biol*, 135, 153-67.
- PETERS, D., G., M. & W., S. 1971. Morphology, Development, and Classification of the Marburg Virus. *Martini G.A., Siebert R. (eds) Marburg Virus Disease.*: Springer, Berlin, Heidelberg.
- PFEFFER, S. & AIVAZIAN, D. 2004. Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 886-96.
- POTTER, B. A., IHRKE, G., BRUNS, J. R., WEIXEL, K. M. & WEISZ, O. A. 2004. Specific N-glycans direct apical delivery of transmembrane, but not soluble or glycosylphosphatidylinositol-anchored forms of endolyn in Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell*, 15, 1407-16.
- POTTER, B. A., WEIXEL, K. M., BRUNS, J. R., IHRKE, G. & WEISZ, O. A. 2006. N-glycans mediate apical recycling of the sialomucin endolyn in polarized MDCK cells. *Traffic*, 7, 146-54.
- PROVANCE, D. W., JR., ADDISON, E. J., WOOD, P. R., CHEN, D. Z., SILAN, C. M. & MERCER, J. A. 2008. Myosin-Vb functions as a dynamic tether for peripheral endocytic compartments during transferrin trafficking. *BMC Cell Biol*, 9, 44.
- QI, M., WILLIAMS, J. A., CHU, H., CHEN, X., WANG, J. J., DING, L., AKHIROME, E., WEN, X., LAPIERRE, L. A., GOLDENRING, J. R. & SPEARMAN, P. 2013. Rab11-FIP1C and Rab14 direct plasma membrane sorting and particle incorporation of the HIV-1 envelope glycoprotein complex. *PLoS Pathog*, 9, e1003278.
- QIN, H., SHAO, Q., IGDOURA, S. A., ALAOUI-JAMALI, M. A. & LAIRD, D. W. 2003. Lysosomal and proteasomal degradation play distinct roles in the life cycle of Cx43 in gap junctional



- intercellular communication-deficient and -competent breast tumor cells. *J Biol Chem*, 278, 30005-14.
- QIU, X., WONG, G., AUDET, J., BELLO, A., FERNANDO, L., ALIMONTI, J. B., FAUSTHER-BOVENDO, H., WEI, H., AVILES, J., HIATT, E., JOHNSON, A., MORTON, J., SWOPE, K., BOHOROV, O., BOHOROVA, N., GOODMAN, C., KIM, D., PAULY, M. H., VELASCO, J., PETTITT, J., OLINGER, G. G., WHALEY, K., XU, B., STRONG, J. E., ZEITLIN, L. & KOBINGER, G. P. 2014. Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp. *Nature*, 514, 47-53.
- RADTKE, K., DOHNER, K. & SODEIK, B. 2006. Viral interactions with the cytoskeleton: a hitchhiker's guide to the cell. *Cell Microbiol*, 8, 387-400.
- RAMAKRISHNAN, M. A. 2016. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J Virol*, 5, 85-6.
- REN, M., XU, G., ZENG, J., DE LEMOS-CHIARANDINI, C., ADESNIK, M. & SABATINI, D. D. 1998. Hydrolysis of GTP on rab11 is required for the direct delivery of transferrin from the pericentriolar recycling compartment to the cell surface but not from sorting endosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 6187-92.
- RINGEL, M., HEINER, A., BEHNER, L., HALWE, S., SAUERHERING, L., BECKER, N., DIETZEL, E., SAWATSKY, B., KOLESNIKOVA, L. & MAISNER, A. 2019. Nipah virus induces two inclusion body populations: Identification of novel inclusions at the plasma membrane. *PLoS Pathog*, 15, e1007733.
- ROBERTS, P. C., GARTEN, W. & KLENK, H. D. 1993. Role of conserved glycosylation sites in maturation and transport of influenza A virus hemagglutinin. *J Virol*, 67, 3048-60.
- ROBINSON, M., SCHOR, S., BAROUCH-BENTOV, R. & EINAV, S. 2018. Viral journeys on the intracellular highways. *Cell Mol Life Sci*, 75, 3693-3714.
- RODRIGUEZ, O. C. & CHENEY, R. E. 2002. Human myosin-Vc is a novel class V myosin expressed in epithelial cells. *J Cell Sci*, 115, 991-1004.
- ROLAND, J. T., BRYANT, D. M., DATTA, A., ITZEN, A., MOSTOV, K. E. & GOLDENRING, J. R. 2011. Rab GTPase-Myo5B complexes control membrane recycling and epithelial polarization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 2789-94.
- ROLAND, J. T., KENWORTHY, A. K., PERANEN, J., CAPLAN, S. & GOLDENRING, J. R. 2007. Myosin Vb interacts with Rab8a on a tubular network containing EHD1 and EHD3. *Mol Biol Cell*, 18, 2828-37.
- ROLAND, J. T., LAPIERRE, L. A. & GOLDENRING, J. R. 2009. Alternative splicing in class V myosins determines association with Rab10. *J Biol Chem*, 284, 1213-23.
- ROSE, J. K., WELCH, W. J., SEFTON, B. M., ESCH, F. S. & LING, N. C. 1980. Vesicular stomatitis virus glycoprotein is anchored in the viral membrane by a hydrophobic domain near the COOH terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77, 3884-8.
- ROTH, M. G., COMPANS, R. W., GIUSTI, L., DAVIS, A. R., NAYAK, D. P., GETHING, M. J. & SAMBROOK, J. 1983. Influenza virus hemagglutinin expression is polarized in cells infected with recombinant SV40 viruses carrying cloned hemagglutinin DNA. *Cell*, 33, 435-43.
- ROWE, R. K., SUSZKO, J. W. & PEKOSZ, A. 2008. Roles for the recycling endosome, Rab8, and Rab11 in hantavirus release from epithelial cells. *Virology*, 382, 239-49.
- SAEED, M. F., KOLOKOLTSOV, A. A., ALBRECHT, T. & DAVEY, R. A. 2010. Cellular entry of ebola virus involves uptake by a macropinocytosis-like mechanism and subsequent trafficking through early and late endosomes. *PLoS Pathog*, 6, e1001110.
- SANCHEZ, A., TRAPPIER, S. G., MAHY, B. W., PETERS, C. J. & NICHOL, S. T. 1996. The virion glycoproteins of Ebola viruses are encoded in two reading frames and are expressed through transcriptional editing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 3602-7.
- SANGER, C., MUHLBERGER, E., LOTFERING, B., KLENK, H. D. & BECKER, S. 2002. The Marburg virus surface protein GP is phosphorylated at its ectodomain. *Virology*, 295, 20-9.
- SANGER, C., MUHLBERGER, E., RYABCHIKOVA, E., KOLESNIKOVA, L., KLENK, H. D. & BECKER, S. 2001. Sorting of Marburg virus surface protein and virus release take place at opposite surfaces of



- infected polarized epithelial cells. *J Virol*, 75, 1274-83.
- SATO, T., IWANO, T., KUNII, M., MATSUDA, S., MIZUGUCHI, R., JUNG, Y., HAGIWARA, H., YOSHIHARA, Y., YUZAKI, M., HARADA, R. & HARADA, A. 2014. Rab8a and Rab8b are essential for several apical transport pathways but insufficient for ciliogenesis. *J Cell Sci*, 127, 422-31.
- SATO, T., MUSHIAKE, S., KATO, Y., SATO, K., SATO, M., TAKEDA, N., OZONO, K., MIKI, K., KUBO, Y., TSUJI, A., HARADA, R. & HARADA, A. 2007. The Rab8 GTPase regulates apical protein localization in intestinal cells. *Nature*, 448, 366-9.
- SCHAFER, J. C., BAETZ, N. W., LAPIERRE, L. A., MCRAE, R. E., ROLAND, J. T. & GOLDENRING, J. R. 2014. Rab11-FIP2 interaction with MYO5B regulates movement of Rab11a-containing recycling vesicles. *Traffic*, 15, 292-308.
- SCHEIFFELE, P., ROTH, M. G. & SIMONS, K. 1997. Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain. *Embo j*, 16, 5501-8.
- SCHINDELIN, J., ARGANDA-CARRERAS, I., FRISE, E., KAYNIG, V., LONGAIR, M., PIETZSCH, T., PREIBISCH, S., RUEDEN, C., SAALFELD, S., SCHMID, B., TINEVEZ, J. Y., WHITE, D. J., HARTENSTEIN, V., ELICEIRI, K., TOMANCAK, P. & CARDONA, A. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*, 9, 676-82.
- SCHLIERF, B., FEY, G. H., HAUBER, J., HOCKE, G. M. & ROSORIUS, O. 2000. Rab11b is essential for recycling of transferrin to the plasma membrane. *Exp Cell Res*, 259, 257-65.
- SCHMIDT, M. L. & HOENEN, T. 2017. Characterization of the catalytic center of the Ebola virus L polymerase. *PLoS Negl Trop Dis*, 11, e0005996.
- SCHUDT, G. 2013. *Untersuchungen zum intrazellulären Transportmechanismus von Marburgvirus Nukleokapsiden*. Ph.D., Philipps-University Marburg.
- SCHUDT, G., DOLNIK, O., KOLESNIKOVA, L., BIEDENKOPF, N., HERWIG, A. & BECKER, S. 2015. Transport of Ebolavirus Nucleocapsids Is Dependent on Actin Polymerization: Live-Cell Imaging Analysis of Ebolavirus-Infected Cells. *J Infect Dis*, 212 Suppl 2, S160-6.
- SCHUDT, G., KOLESNIKOVA, L., DOLNIK, O., SODEIK, B. & BECKER, S. 2013. Live-cell imaging of Marburg virus-infected cells uncovers actin-dependent transport of nucleocapsids over long distances. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 14402-7.
- SELVARAJ, S. A., LEE, K. E., HARRELL, M., IVANOV, I. & ALLEGIANZI, B. 2018. Infection Rates and Risk Factors for Infection Among Health Workers During Ebola and Marburg Virus Outbreaks: A Systematic Review. *J Infect Dis*, 218, S679-s689.
- SFAKIANOS, J. N. & HUNTER, E. 2003. M-PMV capsid transport is mediated by Env/Gag interactions at the pericentriolar recycling endosome. *Traffic*, 4, 671-80.
- SHEFF, D. R., DARO, E. A., HULL, M. & MELLMAN, I. 1999. The receptor recycling pathway contains two distinct populations of early endosomes with different sorting functions. *J Cell Biol*, 145, 123-39.
- SHI, X., BRAUBURGER, K. & ELLIOTT, R. M. 2005. Role of N-linked glycans on bunyamwera virus glycoproteins in intracellular trafficking, protein folding, and virus infectivity. *J Virol*, 79, 13725-34.
- SIEGERT, R., SHU, H. L. & SLENCZKA, W. 1968. [Isolation and identification of the "Marburg virus"]. *Dtsch Med Wochenschr*, 93, 604-12.
- SIEGERT, R., SHU, H. L., SLENCZKA, W., PETERS, D. & MULLER, G. 1967. [On the etiology of an unknown human infection originating from monkeys]. *Dtsch Med Wochenschr*, 92, 2341-3.
- SIMONS, K. & SAMPALIO, J. L. 2011. Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3, a004697.
- SIMPSON, D. I. 1977. Marburg fever. *Nurs Mirror*, 144, 13-5.
- SISSOKO, D., LAOUEAN, C., FOLKESSON, E., M'LEBING, A. B., BEAVOGUI, A. H., BAIZE, S., CAMARA, A. M., MAES, P., SHEPHERD, S., DANIEL, C., CARAZO, S., CONDE, M. N., GALA, J. L., COLIN, G., SAVINI, H., BORE, J. A., LE MARCIS, F., KOUNDOUNO, F. R., PETITJEAN, F., LAMAH, M. C., DIEDERICH, S., TOUNKARA, A., POELART, G., BERBAIN, E., DINDART, J. M., DURAFFOUR, S.,

- LEFEVRE, A., LENO, T., PEYROUSET, O., IRENGE, L., BANGOURA, N., PALICH, R., HINZMANN, J., KRAUS, A., BARRY, T. S., BERETTE, S., BONGONO, A., CAMARA, M. S., CHANFREAU MUNOZ, V., DOUMBOUYA, L., SOULEY, H., KIGHOMA, P. M., RENE, L., LOUA, C. M., MASSALA, V., MOUMOUNI, K., PROVOST, C., SAMAKE, N., SEKOU, C., SOUMAH, A., ARNOULD, I., KOMANO, M. S., GUSTIN, L., BERUTTO, C., CAMARA, D., CAMARA, F. S., COLPAERT, J., DELAMOU, L., JANSSON, L., KOUROUMA, E., LOUA, M., MALME, K., MANFRIN, E., MAOMOU, A., MILINOULO, A., OMBELET, S., SIDIBOUN, A. Y., VERRECKT, I., YOMBOUNO, P., BOCQUIN, A., CARBONNELLE, C., CARMOI, T., FRANGE, P., MELY, S., NGUYEN, V. K., PANNETIER, D., TABURET, A. M., TRELUYER, J. M., KOLIE, J., MOH, R., GONZALEZ, M. C., KUISMA, E., LIEDIGK, B., NGABO, D., RUDOLF, M., THOM, R., KERBER, R., GABRIEL, M., DI CARO, A., WOLFEL, R., BADIR, J., BENTAHIR, M., DECCACHE, Y., DUMONT, C., DURANT, J. F., EL BAKKOURI, K., GASASIRA UWAMAHORO, M., SMITS, B., TOUFIK, N., VAN CAUWENBERGHE, S., et al. 2016. Experimental Treatment with Favipiravir for Ebola Virus Disease (the JIKI Trial): A Historically Controlled, Single-Arm Proof-of-Concept Trial in Guinea. *PLoS Med*, 13, e1001967.
- SLATER-HANDSHY, T., DROLL, D. A., FAN, X., DI BISCEGLIE, A. M. & CHAMBERS, T. J. 2004. HCV E2 glycoprotein: mutagenesis of N-linked glycosylation sites and its effects on E2 expression and processing. *Virology*, 319, 36-48.
- SOLDATI, T., RANCANO, C., GEISSLER, H. & PFEFFER, S. R. 1995. Rab7 and Rab9 are recruited onto late endosomes by biochemically distinguishable processes. *J Biol Chem*, 270, 25541-8.
- STENMARK, H. 2009. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 513-25.
- STENMARK, H., PARTON, R. G., STEELE-MORTIMER, O., LUTCKE, A., GRUENBERG, J. & ZERIAL, M. 1994. Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *Embo j*, 13, 1287-96.
- STILLE, W. & E., B. 1971. Clinical Course and Prognosis of Marburg Virus ("Green-Monkey") Disease. *Martini G.A., Siebert R. (eds) Marburg Virus Disease.*: Springer, Berlin, Heidelberg.
- STONE, J. A., NICOLA, A. V., BAUM, L. G. & AGUILAR, H. C. 2016. Multiple Novel Functions of Henipavirus O-glycans: The First O-glycan Functions Identified in the Paramyxovirus Family. *PLoS Pathog*, 12, e1005445.
- STONE, R., HAYASHI, T., BAJIMAYA, S., HODGES, E. & TAKIMOTO, T. 2016b. Critical role of Rab11a-mediated recycling endosomes in the assembly of type I parainfluenza viruses. *Virology*, 487, 11-8.
- STOOPS, E. H. & CAPLAN, M. J. 2014. Trafficking to the apical and basolateral membranes in polarized epithelial cells. *J Am Soc Nephrol*, 25, 1375-86.
- STOOPS, E. H., HULL, M. & CAPLAN, M. J. 2016. Newly synthesized and recycling pools of the apical protein gp135 do not occupy the same compartments. *Traffic*, 17, 1272-1285.
- STROHER, U., WILLIHNGANZ, L., JEAN, F. & FELDMANN, H. 2007. Blockage of filoviral glycoprotein processing by use of a protein-based inhibitor. *J Infect Dis*, 196 Suppl 2, S271-5.
- SWANEPOEL, R., SMIT, S. B., ROLLIN, P. E., FORMENTY, P., LEMAN, P. A., KEMP, A., BURT, F. J., GROBBELAAR, A. A., CROFT, J., BAUSCH, D. G., ZELLER, H., LEIRS, H., BRAACK, L. E., LIBANDE, M. L., ZAKI, S., NICHOL, S. T., KSIAZEK, T. G. & PAWESKA, J. T. 2007. Studies of reservoir hosts for Marburg virus. *Emerg Infect Dis*, 13, 1847-51.
- SWENSON, D. L., WARFIELD, K. L., KUEHL, K., LARSEN, T., HEVEY, M. C., SCHMALJOHN, A., BAVARI, S. & AMAN, M. J. 2004. Generation of Marburg virus-like particles by co-expression of glycoprotein and matrix protein. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 40, 27-31.
- TAGUCHI, T. 2013. Emerging roles of recycling endosomes. *J Biochem*, 153, 505-10.
- TAKACS, C. N., ANDREO, U., DAO THI, V. L., WU, X., GLEASON, C. E., ITANO, M. S., SPITZ-BECKER, G. S., BELOTE, R. L., HEDIN, B. R., SCULL, M. A., RICE, C. M. & SIMON, S. M. 2017. Differential Regulation of Lipoprotein and Hepatitis C Virus Secretion by Rab1b. *Cell Rep*, 21, 431-441.
- TAKADA, A., FUJIOKA, K., TSUIJI, M., MORIKAWA, A., HIGASHI, N., EBIHARA, H., KOBASA, D., FELDMANN, H., IRIMURA, T. & KAWAOKA, Y. 2004. Human macrophage C-type lectin specific

- for galactose and N-acetylgalactosamine promotes filovirus entry. *J Virol*, 78, 2943-7.
- TAKAMATSU, Y., KOLESNIKOVA, L. & BECKER, S. 2018. Ebola virus proteins NP, VP35, and VP24 are essential and sufficient to mediate nucleocapsid transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115, 1075-1080.
- TANAKA, Y., ONO, N., SHIMA, T., TANAKA, G., KATOH, Y., NAKAYAMA, K., TAKATSU, H. & SHIN, H. W. 2016. The phospholipid flippase ATP9A is required for the recycling pathway from the endosomes to the plasma membrane. *Mol Biol Cell*, 27, 3883-3893.
- TANG, Y., WINKLER, U., FREED, E. O., TORREY, T. A., KIM, W., LI, H., GOFF, S. P. & MORSE, H. C., 3RD 1999. Cellular motor protein KIF-4 associates with retroviral Gag. *J Virol*, 73, 10508-13.
- THOMAS, D. C., BREWER, C. B. & ROTH, M. G. 1993. Vesicular stomatitis virus glycoprotein contains a dominant cytoplasmic basolateral sorting signal critically dependent upon a tyrosine. *J Biol Chem*, 268, 3313-20.
- THUENAUER, R., HSU, Y. C., CARVAJAL-GONZALEZ, J. M., DEBORDE, S., CHUANG, J. Z., ROMER, W., SONNLEITNER, A., RODRIGUEZ-BOULAN, E. & SUNG, C. H. 2014. Four-dimensional live imaging of apical biosynthetic trafficking reveals a post-Golgi sorting role of apical endosomal intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 4127-32.
- TIGABU, B., RAMANATHAN, P., IVANOV, A., LIN, X., ILINYKH, P. A., PARRY, C. S., FREIBERG, A. N., NEKHAI, S. & BUKREYEV, A. 2018. PHOSPHORYLATED VP30 OF MARBURG VIRUS IS A REPRESSOR OF TRANSCRIPTION. *J Virol*.
- TISDALE, E. J., BOURNE, J. R., KHOSRAVI-FAR, R., DER, C. J. & BALCH, W. E. 1992. GTP-binding mutants of rab1 and rab2 are potent inhibitors of vesicular transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *J Cell Biol*, 119, 749-61.
- TOWNER, J. S., AMMAN, B. R., SEALY, T. K., CARROLL, S. A., COMER, J. A., KEMP, A., SWANEPOEL, R., PADDOCK, C. D., BALINANDI, S., KHRISTOVA, M. L., FORMENTY, P. B., ALBARINO, C. G., MILLER, D. M., REED, Z. D., KAYIWA, J. T., MILLS, J. N., CANNON, D. L., GREER, P. W., BYARUHANGA, E., FARNON, E. C., ATIMNEDI, P., OKWARE, S., KATONGOLE-MBIDDE, E., DOWNING, R., TAPPERO, J. W., ZAKI, S. R., KSIAZEK, T. G., NICHOL, S. T. & ROLLIN, P. E. 2009. Isolation of genetically diverse Marburg viruses from Egyptian fruit bats. *PLoS Pathog*, 5, e1000536.
- TOWNER, J. S., KHRISTOVA, M. L., SEALY, T. K., VINCENT, M. J., ERICKSON, B. R., BAWIEC, D. A., HARTMAN, A. L., COMER, J. A., ZAKI, S. R., STROHER, U., GOMES DA SILVA, F., DEL CASTILLO, F., ROLLIN, P. E., KSIAZEK, T. G. & NICHOL, S. T. 2006. Marburgvirus genomics and association with a large hemorrhagic fever outbreak in Angola. *J Virol*, 80, 6497-516.
- TUMA, P. L., NYASAE, L. K. & HUBBARD, A. L. 2002. Nonpolarized cells selectively sort apical proteins from cell surface to a novel compartment, but lack apical retention mechanisms. *Mol Biol Cell*, 13, 3400-15.
- UCHIDA, Y., HASEGAWA, J., CHINNAPEN, D., INOUE, T., OKAZAKI, S., KATO, R., WAKATSUKI, S., MISAKI, R., KOIKE, M., UCHIYAMA, Y., IEMURA, S., NATSUME, T., KUWAHARA, R., NAKAGAWA, T., NISHIKAWA, K., MUKAI, K., MIYOSHI, E., TANIGUCHI, N., SHEFF, D., LENCER, W. I., TAGUCHI, T. & ARAI, H. 2011. Intracellular phosphatidylserine is essential for retrograde membrane traffic through endosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 15846-51.
- ULLRICH, O., REINSCH, S., URBE, S., ZERIAL, M. & PARTON, R. G. 1996. Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J Cell Biol*, 135, 913-24.
- URATA, S., NODA, T., KAWAOKA, Y., MORIKAWA, S., YOKOSAWA, H. & YASUDA, J. 2007. Interaction of Tsg101 with Marburg virus VP40 depends on the PPPY motif, but not the PT/SAP motif as in the case of Ebola virus, and Tsg101 plays a critical role in the budding of Marburg virus-like particles induced by VP40, NP, and GP. *J Virol*, 81, 4895-9.
- URATA, S. & YASUDA, J. 2010. Regulation of Marburg virus (MARV) budding by Nedd4.1: a different WW domain of Nedd4.1 is critical for binding to MARV and Ebola virus VP40. *J Gen Virol*, 91, 228-34.
- URBE, S., HUBER, L. A., ZERIAL, M., TOOZE, S. A. & PARTON, R. G. 1993. Rab11, a small GTPase

- associated with both constitutive and regulated secretory pathways in PC12 cells. *FEBS Lett*, 334, 175-82.
- UYEKI, T. M., ERICKSON, B. R., BROWN, S., MCELROY, A. K., CANNON, D., GIBBONS, A., SEALY, T., KAINULAINEN, M. H., SCHUH, A. J., KRAFT, C. S., MEHTA, A. K., LYON, G. M., 3RD, VARKEY, J. B., RIBNER, B. S., ELLISON, R. T., 3RD, CARMODY, E., NAU, G. J., SPIROPOULOU, C., NICHOL, S. T. & STROHER, U. 2016. Ebola Virus Persistence in Semen of Male Survivors. *Clin Infect Dis*, 62, 1552-1555.
- VALE-COSTA, S. & AMORIM, M. J. 2016. Recycling Endosomes and Viral Infection. *Viruses*, 8, 64.
- VALMAS, C. & BASLER, C. F. 2011. Marburg virus VP40 antagonizes interferon signaling in a species-specific manner. *J Virol*, 85, 4309-17.
- VALMAS, C., GROSCH, M. N., SCHUMANN, M., OLEJNIK, J., MARTINEZ, O., BEST, S. M., KRAHLING, V., BASLER, C. F. & MUHLBERGER, E. 2010. Marburg virus evades interferon responses by a mechanism distinct from ebola virus. *PLoS Pathog*, 6, e1000721.
- VARTHAKAVI, V., SMITH, R. M., MARTIN, K. L., DERDOWSKI, A., LAPIERRE, L. A., GOLDENRING, J. R. & SPEARMAN, P. 2006. The pericentriolar recycling endosome plays a key role in Vpu-mediated enhancement of HIV-1 particle release. *Traffic*, 7, 298-307.
- VIGERUST, D. J. & SHEPHERD, V. L. 2007. Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions. *Trends Microbiol*, 15, 211-8.
- VOGEL, G. F., JANECKE, A. R., KRAINER, I. M., GUTLEBEN, K., WITTING, B., MITTON, S. G., MANSOUR, S., BALLAUFF, A., ROLAND, J. T., ENGEVIK, A. C., CUTZ, E., MULLER, T., GOLDENRING, J. R., HUBER, L. A. & HESS, M. W. 2017. Abnormal Rab11-Rab8-vesicles cluster in enterocytes of patients with microvillus inclusion disease. *Traffic*, 18, 453-464.
- VOGT, C., EICKMANN, M., DIEDERICH, S., MOLL, M. & MAISNER, A. 2005. Endocytosis of the Nipah virus glycoproteins. *J Virol*, 79, 3865-72.
- VOLCHKOV, V. E., BECKER, S., VOLCHKOVA, V. A., TERNOVOJ, V. A., KOTOV, A. N., NETESOV, S. V. & KLENK, H. D. 1995. GP mRNA of Ebola virus is edited by the Ebola virus polymerase and by T7 and vaccinia virus polymerases. *Virology*, 214, 421-30.
- VOLCHKOV, V. E., FELDMANN, H., VOLCHKOVA, V. A. & KLENK, H. D. 1998. Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 5762-7.
- VOLCHKOV, V. E., VOLCHKOVA, V. A., STROHER, U., BECKER, S., DOLNIK, O., CIEPLIK, M., GARTEN, W., KLENK, H. D. & FELDMANN, H. 2000. Proteolytic processing of Marburg virus glycoprotein. *Virology*, 268, 1-6.
- VOLCHKOVA, V. A., DOLNIK, O., MARTINEZ, M. J., REYNARD, O. & VOLCHKOV, V. E. 2015. RNA Editing of the GP Gene of Ebola Virus is an Important Pathogenicity Factor. *J Infect Dis*, 212 Suppl 2, S226-33.
- VOLCHKOVA, V. A., FELDMANN, H., KLENK, H. D. & VOLCHKOV, V. E. 1998. The nonstructural small glycoprotein sGP of Ebola virus is secreted as an antiparallel-orientated homodimer. *Virology*, 250, 408-14.
- VON WANGENHEIM, D., ROSERO, A., KOMIS, G., SAMAJOVA, O., OVECKA, M., VOIGT, B. & SAMAJ, J. 2015. Endosomal Interactions during Root Hair Growth. *Front Plant Sci*, 6, 1262.
- WALSH, D., MATHEWS, M. B. & MOHR, I. 2013. Tinkering with translation: protein synthesis in virus-infected cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5, a012351.
- WANG, B., WANG, Y., FRABUTT, D. A., ZHANG, X., YAO, X., HU, D., ZHANG, Z., LIU, C., ZHENG, S., XIANG, S. H. & ZHENG, Y. H. 2017. Mechanistic understanding of N-glycosylation in Ebola virus glycoprotein maturation and function. *J Biol Chem*, 292, 5860-5870.
- WANG, X., KUMAR, R., NAVARRE, J., CASANOVA, J. E. & GOLDENRING, J. R. 2000. Regulation of vesicle trafficking in madin-darby canine kidney cells by Rab11a and Rab25. *J Biol Chem*, 275, 29138-46.
- WANG, Y., LUPIANI, B., REDDY, S. M., LAMONT, S. J. & ZHOU, H. 2014. RNA-seq analysis revealed novel genes and signaling pathway associated with disease resistance to avian influenza virus infection in chickens. *Poult Sci*, 93, 485-93.

- WANG, Z., EDWARDS, J. G., RILEY, N., PROVANCE, D. W., JR., KARCHER, R., LI, X. D., DAVISON, I. G., IKEBE, M., MERCER, J. A., KAUER, J. A. & EHLERS, M. D. 2008. Myosin Vb mobilizes recycling endosomes and AMPA receptors for postsynaptic plasticity. *Cell*, 135, 535-48.
- WEIS, M. & MAISNER, A. 2015. Nipah virus fusion protein: Importance of the cytoplasmic tail for endosomal trafficking and bioactivity. *Eur J Cell Biol*, 94, 316-22.
- WEISE, C., ERBAR, S., LAMP, B., VOGT, C., DIEDERICH, S. & MAISNER, A. 2010. Tyrosine residues in the cytoplasmic domains affect sorting and fusion activity of the Nipah virus glycoproteins in polarized epithelial cells. *J Virol*, 84, 7634-41.
- WEISSENHORN, W., CALDER, L. J., WHARTON, S. A., SKEHEL, J. J. & WILEY, D. C. 1998. The central structural feature of the membrane fusion protein subunit from the Ebola virus glycoprotein is a long triple-stranded coiled coil. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 6032-6.
- WEISZ, O. A. & RODRIGUEZ-BOULAN, E. 2009. Apical trafficking in epithelial cells: signals, clusters and motors. *J Cell Sci*, 122, 4253-66.
- WELSCH, S., KOLESNIKOVA, L., KRAHLING, V., RICHES, J. D., BECKER, S. & BRIGGS, J. A. 2010. Electron tomography reveals the steps in filovirus budding. *PLoS Pathog*, 6, e1000875.
- WELZ, T., WELLBOURNE-WOOD, J. & KERKHOFF, E. 2014. Orchestration of cell surface proteins by Rab11. *Trends Cell Biol*.
- WEN, X., DING, L., HUNTER, E. & SPEARMAN, P. 2014. An siRNA screen of membrane trafficking genes highlights pathways common to HIV-1 and M-PMV virus assembly and release. *PLoS One*, 9, e106151.
- WENIGENRATH, J., KOLESNIKOVA, L., HOENEN, T., MITTLER, E. & BECKER, S. 2010. Establishment and application of an infectious virus-like particle system for Marburg virus. *J Gen Virol*, 91, 1325-34.
- WHO 1978. Ebola haemorrhagic fever in Zaire, 1976. *Bull World Health Organ*, 56, 271-93.
- WHO. 2017. *WHO | Marburg virus disease – Uganda and Kenya* [Online]. World Health Organization. Available: <https://www.who.int/csr/don/15-november-2017-marburg-uganda-kenya/en/> [Accessed].
- WHO. 2019. *WHO | Ebola virus disease – Democratic Republic of the Congo* [Online]. World Health Organization. Available: <https://www.who.int/csr/don/02-may-2019-ebola-drc/en/> [Accessed].
- WIJESINGHE, K. J. & STAHELIN, R. V. 2015. Investigation of the Lipid Binding Properties of the Marburg Virus Matrix Protein VP40. *J Virol*, 90, 3074-85.
- WIJESINGHE, K. J., URATA, S., BHATTARAI, N., KOOIJMAN, E. E., GERSTMAN, B. S., CHAPAGAIN, P. P., LI, S. & STAHELIN, R. V. 2017. Detection of lipid-induced structural changes of the Marburg virus matrix protein VP40 using hydrogen/deuterium exchange-mass spectrometry. *J Biol Chem*, 292, 6108-6122.
- WILL, C., MUHLBERGER, E., LINDER, D., SLENCZKA, W., KLENK, H. D. & FELDMANN, H. 1993. Marburg virus gene 4 encodes the virion membrane protein, a type I transmembrane glycoprotein. *J Virol*, 67, 1203-10.
- WILSON, I. A., SKEHEL, J. J. & WILEY, D. C. 1981. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature*, 289, 366-73.
- WU, X., BOWERS, B., RAO, K., WEI, Q. & HAMMER, J. A., 3RD 1998. Visualization of melanosome dynamics within wild-type and dilute melanocytes suggests a paradigm for myosin V function In vivo. *J Cell Biol*, 143, 1899-918.
- WU, X., RAO, K., BOWERS, M. B., COPELAND, N. G., JENKINS, N. A. & HAMMER, J. A., 3RD 2001. Rab27a enables myosin Va-dependent melanosome capture by recruiting the myosin to the organelle. *J Cell Sci*, 114, 1091-100.
- YAMAYOSHI, S., NODA, T., EBIHARA, H., GOTO, H., MORIKAWA, Y., LUKASHEVICH, I. S., NEUMANN, G., FELDMANN, H. & KAWAOKA, Y. 2008. Ebola virus matrix protein VP40 uses the COPII transport system for its intracellular transport. *Cell Host Microbe*, 3, 168-77.
- YANG, X. L., TAN, C. W., ANDERSON, D. E., JIANG, R. D., LI, B., ZHANG, W., ZHU, Y., LIM, X. F., ZHOU,



- P., LIU, X. L., GUAN, W., ZHANG, L., LI, S. Y., ZHANG, Y. Z., WANG, L. F. & SHI, Z. L. 2019. Characterization of a filovirus (Mengla virus) from Rousettus bats in China. *Nat Microbiol.*
- YEAMAN, C., LE GALL, A. H., BALDWIN, A. N., MONLAUZEUR, L., LE BIVIC, A. & RODRIGUEZ-BOULAN, E. 1997. The O-glycosylated stalk domain is required for apical sorting of neurotrophin receptors in polarized MDCK cells. *J Cell Biol*, 139, 929-40.
- YEUNG, T., GILBERT, G. E., SHI, J., SILVIUS, J., KAPUS, A. & GRINSTEIN, S. 2008. Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization. *Science*, 319, 210-3.
- ZHAO, L. P., KOSLOVSKY, J. S., REINHARD, J., BAHLER, M., WITT, A. E., PROVANCE, D. W., JR. & MERCER, J. A. 1996. Cloning and characterization of myr 6, an unconventional myosin of the dilute/myosin-V family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 10826-31.

Zusätzlich wurde auf folgenden Artikel aus der Lokalzeitung *Oberhessische Presse* Bezug genommen:

Mysteriöse Erkrankung von elf Angestellten. *Oberhessische Presse*, 24.08.1967, p.4.



## I Abbildungsverzeichnis

	Seite
<b><u>Einleitung</u></b>	
<b>Abbildung 2.1</b> Taxonomie der Filoviren in der Ordnung Mononegavirales (nach Maes et al., 2019).	10
<b>Abbildung 2.2</b> Geographische Lokalisation und Fallzahlen der MARV Ausbrüche von 1967 bis 2017.	11
<b>Abbildung 2.3</b> Aufbau und Morphologie des MARV.	16
<b>Abbildung 2.4</b> Schematischer Aufbau von MARV-GP.	17
<b>Abbildung 2.5</b> Replikationszyklus des MARV.	25
<b>Abbildung 2.6</b> Nutzung des endosomalen Recycling-Systems durch verschiedene Viren.	32
<b>Abbildung 2.7</b> Arbeitsmodell des intrazellulären Transports von MARV-GP und Fragestellung der Arbeit.	34
<b><u>Methoden</u></b>	
<b>Abbildung 4.1</b> Prinzip des Oberflächenbiotinylierungs-Assays.	56
<b>Abbildung 4.2</b> Prinzip des Antikörper-Aufnahme-Assays.	59
<b><u>Ergebnisse</u></b>	
<b>Abbildung 5.1</b> MARV-GP kolokalisiert mit den Recycling Endosom-Markern TfR und Rab11.	68
<b>Abbildung 5.2</b> MARV-GP kolokalisiert mit NiV-F, wird jedoch nicht von der PM re-endozytiert.	72
<b>Abbildung 5.3</b> Rab-GTPasen des Recycling Endosoms akkumulieren in peripheren MARV-VP40 Clustern .	74
<b>Abbildung 5.4</b> MARV-GP kolokalisiert mit dem Recycling Endosom-Marker Rab11 in MARV-infizierten Zellen.	78
<b>Abbildung 5.5</b> MARV-GP kolokalisiert in zentralen Bereichen infizierter Zellen mit GFP-Rab11 und assoziiert in der Peripherie mit VP40.	80
<b>Abbildung 5.6</b> Kotransport von MARV-GPΔMLD-mCh und GFP-Rab11 in der Lebendzellmikroskopie.	84
<b>Abbildung 5.7</b> DN und KA Rab11-Mutanten zeigen eine Kolokalisation mit MARV-GP, besitzen aber nur geringen Einfluss auf die Verteilung von GP.	86
<b>Abbildung 5.8</b> Die Depletion von Rab11 hat keinen Einfluss auf die Verteilung und den Oberflächentransport von MARV-GP.	88

<b>Abbildung 5.9</b>	Die Expression des DN MyoVb Tail führt zu einer aberranten intrazellulären Verteilung von MARV-GP.	93
<b>Abbildung 5.10</b>	Der Einfluss von von DN MyoVb Tail auf die Verteilung von MARV-GP ist reproduzierbar in MARV-infizierten Zellen.	97
<b>Abbildung 5.11</b>	MyoVb Tail-induzierte Aggregationen kolokalisieren spezifisch mit Recycling Endosomen und enthalten kein MARV-NP oder MARV-VP40.	100
<b>Abbildung 5.12</b>	MARV-GP erreicht das MyoVb Tail-Kompartiment in einem <i>post</i> -Golgi-Schritt.	102
<b>Abbildung 5.13</b>	Die Expression des DN MyoVb Tail führt zu einer Reduktion von MARV-GP an der Zelloberfläche (IFA).	104
<b>Abbildung 5.14</b>	Die Expression des DN MyoVb Tail führt zu einer Reduktion von MARV-GP an der Zelloberfläche (OBA).	107
<b>Abbildung 5.15</b>	Die Expression des DN MyoVb Tail führt zu einer Reduktion der Assoziation von MARV-GP mit peripheren VP40-Clustern.	109
<b>Abbildung 5.16</b>	Die meisten Oberflächenproteine von anderen RNA-Viren werden wie MARV-GP in perinukleäre MyoVb Tail-Aggregate und in periphere MARV-VP40-Cluster rekrutiert.	113

## Diskussion

<b>Abbildung 6.1</b>	Analyse der differentiellen Expression von 20 ausgewählten Genen mit Funktionen im endosomalen Recycling-System nach Infektion mit dem MARV.	128
<b>Abbildung 6.2</b>	Mögliche Transportwege von MARV-GP und -VP40 in Verbindung mit dem endosomalen Recycling-System.	132
<b>Abbildung 6.3</b>	Arbeitsmodell des intrazellulären Transports von MARV-GP.	138



## II Tabellenverzeichnis

	Seite
<b><u>Material</u></b>	
<b>Tabelle 3.1</b>	Für PCR und Sequenzierungen verwendete Primer. 43
<b>Tabelle 3.2</b>	Verwendete Primär-Antikörper. 46
<b>Tabelle 3.3</b>	Verwendete Sekundär-Antikörper. 47
<b><u>Methoden</u></b>	
<b>Tabelle 4.1</b>	Volumina der Transfektionsansätze in verschiedenen Zellkulturplatten. 55
<b><u>Ergebnisse</u></b>	
<b>Tabelle 5.1</b>	Überblick der für die Kolo-kalisationsanalysen verwendeten endosomalen Markerproteine 67
<b>Tabelle 5.2</b>	Überblick über die VP40-induzierte Redistribution von endosomalen Markerproteinen 76
<b>Tabelle 5.3</b>	Überblick über die analysierten viralen Oberflächenproteine 112



### III Verzeichnis der Videos

	Abb.	Seite
<b><u>Video 1</u></b> Kotransport von MARV-GPΔMLD-mCh und GFP-Rab11 in der Lebendzellmikroskopie (gesamte Zelle)	5.6	84
<b><u>Video 2</u></b> Kotransport von MARV-GPΔMLD-mCh und GFP-Rab11 in der Lebendzellmikroskopie (grüner Kasten)	5.6 (i)	84
<b><u>Video 3</u></b> Kotransport von MARV-GPΔMLD-mCh und GFP-Rab11 in der Lebendzellmikroskopie (blauer Kasten)	5.6 (ii)	84
<b><u>Video 4</u></b> Die Expression des DN MyoVb Tail führt zu einer aberranten intrazellulären Verteilung von MARV-GP (gesamte Zelle)	5.9 C	94
<b><u>Video 5</u></b> Die Expression des DN MyoVb Tail führt zu einer aberranten intrazellulären Verteilung von MARV-GP (grüner Kasten)	5.9 C	94
<b><u>Video 6</u></b> Die Expression des DN MyoVb Tail führt zu einer aberranten intrazellulären Verteilung von MARV-GP (blauer Kasten)	5.9 C	94

Alle Videos befinden sich auf einer CD im Anhang dieser Arbeit und sind zusätzlich unter folgendem Link und dem Passwort „Marburg“ abrufbar:

<https://box.uni-marburg.de/index.php/s/37Mx4qWlq1q3Qps>

## IV Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	anti
Abb.	Abbildung
AEE	apikales frühes Endosom
AIP	Alkaline Phosphatase
ANOVA	
AP	Adaptorprotein
ARE	apikales Recycling Endosom
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BDBV	Bundibugyo Virus
BEE	basolaterales frühes Endosom
BSL	Biosafety Level
BUNV	Bunyamwera Virus
CARC	gespiegeltes CRAC-Motiv
CD	Zytoplasmatische Domäne
CD (in CD63/CD151)	<i>„cluster of differentiation“</i>
CDC	<i>„Centers for Disease Control and Prevention“</i>
cDNA	<i>„complementary DNA“</i>
ChAd3	Schimpanzen-Adenovirus 3
CHR	C-terminales Heptadenmuster ( <i>„C-terminal heptad repeat“</i> )
COPII	<i>„coat protein complex II“</i>
CRAC	<i>„cholesterol recognition/interaction amino acid consensus“</i>
CRE	<i>„common recycling endosome“</i>
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DC-SIGN	<i>„dendritic cell specific ICAM-3-grabbing non-integrin“</i>
$\Delta$	ohne (z.B. <i>„<math>\Delta</math>MLD“</i> = ohne MLD)
DN	dominant-negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
def	<i>„deficient“</i>
dNTP	2' -Desoxynukleosidtriphosphat
EBOV	Ebola Virus
ED	Ektodomäne
EEA1	<i>„early endosome antigen 1“</i>
EHD	<i>„Eps 15 homology domain containing protein“</i>
Endo H	Endoglykosidase H
env	<i>„envelope“-Protein (HIV)</i>
(r)ER	(raues) Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	<i>„ER-Golgi intermediate compartment“</i>
ESCRT	<i>„endosomal sorting complex required for transport“</i>
F	Fusionsprotein (NiV)
FCS	Fötales Kälberserum ( <i>„fetal calf serum“</i> )
G	Glykoprotein (VSV, NiV)
gag	<i>„group-specific antigen“ (HIV)</i>

GDP	Guanosindiphosphat
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GM130	„ <i>Golgi matrix protein 130</i> “
GP	Glykoprotein (MARV, EBOV)
GTP	Guanosintriphosphat
HA	Hämagglutinin (IAV)
HBV	Hepatitis B-Virus
HCV	Hepatitis C-Virus
HeV	Hendra Virus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
hGML	„ <i>human macrophage galactose- and N-acetylgalactosamine-specific C-type lectin</i> “
hpi	Stunden <i>post infectionem</i>
hpt	Stunden <i>post transfectionem</i>
HSV	Herpes Simplex Virus
HuH7	Humane Hepatokarzinomzellen 7
IAV	Influenza A-Virus
IBV	Infuenza B-Virus
IFA	Immunfluoreszenzanalyse
IF-BB	Blockierungspuffer für Immunfluoreszenz
IFL	interne Fusionsschleife („ <i>internal fusion loop</i> “)
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
JEV	Japanisches Enzephalitis Virus
KA	konstitutiv-aktiv
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KIF	„ <i>Kinesin-related protein</i> “
KLSM	Konfokales Laserscanning Mikroskop
Lamp-1/-2	„ <i>Lysosomal-associated membrane protein 1/2</i> “
LASV	Lassa Virus
LLOV	Lloviu Virus
L-Protein	„ <i>Large</i> “-Protein (Polymerase)
LSEctin	„ <i>liver and lymph node sinusoidal endothelial cell C-type lectin</i> “
MARV	Marburg Virus
mCh	mCherry
MeV	Masern Virus
MLD	Muzin-ähnliche Domäne („ <i>mucin like domain</i> “)
mRNA	„ <i>messenger RNA</i> “
MOI	„ <i>multiplicity of infection</i> “
MT	Mikrotubuli
MTOC	Mikrotubuli-organisierendes Zentrum
MUC1	Mucin 1



MuV	Mumps Virus
MVB	Multivesikulärer Körper („ <i>Multivesicular Body</i> “)
MyoVxT	Myosin V x Tail
NC	Nukleokapsid
NHP	Nicht-menschliche Primaten („ <i>non-human primates</i> “)
NHR	N-terminales Heptadenmuster („ <i>N-terminal heptad repeat</i> “)
NiV	Nipah Virus
NP	Nukleoprotein
NPC-1	Niemann-Pick C1
ns	nicht signifikant
N-Terminus	Amino-Terminus
OBA	Oberflächen-Biotinylierungs-Assay
OLR	Offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCC	Pearson's Korrelationskoeffizient
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („ <i>polymerase chain reaction</i> “)
Pen	Penicillin
PFU	„ <i>plaque forming units</i> “
PM	Plasmamembran
PTC	primäre proximale Tubuluszellen
PS	Phosphatidylserin
preGP <sub>ER</sub>	GP „ <i>precursor</i> “ (ER-Form)
Rab	„ <i>Ras-related protein in brain</i> “
Rab FIP	„ <i>Rab family interacting protein</i> “
RAVV	Raven Virus
RBD	Rezeptorbindende Domäne
RE	Recycling Endosom
RESTV	Reston Virus
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein
RSV	Respiratorisches Synzytialvirus
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
siRNA	„ <i>small interfering RNA</i> “
SNARE	„ <i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i> “
SOPs	„ <i>Standard Operation Procedures</i> “
Strep	Streptomycin
SUDV	Sudan Virus
TAFV	Tai Forest Virus
TCID <sub>50</sub>	„ <i>Tissue Culture Infectious Dose 50</i> “
TfR	Transferrin-Rezeptor
TIM-1	„ <i>T-cell immunoglobulin and mucin domain 1</i> “
TIRF	„ <i>total internal reflection fluorescence</i> “
TGN	<i>trans</i> -Golgi-Netzwerk
TGN46	„ <i>trans Golgi network protein 2</i> “
TMD	Transmembrandomäne



Tsg101	„tumor susceptibility gene 101“
VAMP3	„vesicle associated membrane protein 3“
VIP36	„vesicular integral-membrane protein 36“
VLP	Virus-ähnliches Partikel („virus like particle“)
VP	Virusprotein
Vps4	„vacuolar protein sorting-associated protein 4“
vRNA	virale RNA
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
rVSV	rekombinantes VSV
VLDL	„very low density lipoprotein“
vpu	„viral protein U“ (HIV)
WB	Western Blot
WHO	„World Health Organization“
WNV	West-Nil Virus
wt	Wildtyp
$\lambda$	Lambda (Wellenlänge)

Die Abkürzungen für SI-Einheiten, Nukleotide und Aminosäuren stimmen mit international gültigen Normen überein. Die Abkürzungen der chemischen Substanzen wurden im Materialteil aufgeführt.



## V Lebenslauf

## VI Publikationen

### Publikationen in Fachzeitschriften

---

#### **A Fluorescently Labeled Marburg Virus Glycoprotein as a New Tool to Study Viral Transport and Assembly**

Eva Mittler\*, Gordian Schudt\*, **Sandro Halwe\***, Cornelius Rohde & Stephan Becker

**J Infect Dis**, 2018 Nov 22;218(suppl\_5):S318-S326.

\* *geteilte Erstautorenschaft*

#### **Nipah virus induces two inclusion body populations: Identification of novel inclusions at the plasma membrane**

Marc Ringel, Anja Heiner, Laura Behner, **Sandro Halwe**, Lucie Sauerhering, Nico Becker, Erik Dietzel, Bevan Sawatzky, Larissa Kolesnikova & Andrea Maisner

**PLoS Pathog**, 2019 Apr 29;15(4):e1007733.

### Kongressbeiträge

---

05/2019

#### **First-In-human clinical phase Ia trial of a novel virally vectored vaccine candidate against MERS-CoV**

A. Fathi\*, T. Koch, C. Dahlke, V. Krähling, A. Kupke, N. Okba, **S. Halwe**, C. Rohde, M. Eickmann, A. Volz, T. Hesterkamp, A. Jambrecina, L. Kaltenberg, S. Borregard, M. L. Ly, M. Zinser, E. Bartels, J. Poetsch, R. Neumann, R. Fux, S. Schmiedel, F. Stahl, A. Lohse, B. Haagmans, G. Sutter, S. Becker, M. Addo

Mündlicher Vortrag bei der 2. „*Human & Translational Immunology Conference*“ auf Kos (GR)

03/2019

#### **Inhibition of Myosin Vb-associated recycling pathways disrupts trafficking of Marburg virus glycoprotein**

**S. Halwe\***, Y. Takamatsu, S. Becker, O. Dolnik

Posterpräsentation bei der 29. jährlichen Tagung der Gesellschaft für Virologie (GfV) in Düsseldorf

#### **First-In-Man trial: An MVA-vectored vaccine candidate for Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus is safe and immunogenic**

C. Dahlke\*, T. Koch, A. Fathi, V. Krähling, A. Kupke, **S. Halwe**, C. Rohde, M. Eickmann, A. Volz, T. Hesterkamp, S. Borregard, M. L. Ly, M. Zinser, E.

Bartels, J. Poetsch, R. Neumann, R. Fux, N. Okba, B. L. Haagmans, S. Schmiedel, A. Lohse, G. Sutter, S. Becker, M. Addo

Mündlicher Vortrag in der „*Spotlight Session*“ der 29. jährlichen Tagung der Gesellschaft für Virologie (GfV) in Düsseldorf

12/2018

**The clinical phase 1 MVA-MERS-S vaccine trial shows the vaccine to be safe, well-tolerated and eliciting immune responses**

A. Fathi\*, T. Koch, C. Dahlke, V. Krähling, A. Kupke, **S. Halwe**, C. Rohde, M. Eickmann, A. Volz, T. Hestekamp, A. Jambrecina, L. Kaltenberg, S. Borregard, M. L. Ly, M. Zinser, E. Bartels, J. Poetsch, R. Neumann, R. Fux, S. Schmiedel, F. Stahl, A. Lohse, G. Sutter, S. Becker, M. Addo

Mündlicher Vortrag bei der Jahrestagung des Deutschen Zentrums für Infektionsforschung (DZIF) in Heidelberg

06/2018

**Identification of an Ebola virus VP30-specific kinase that regulates viral transcription**

Y. Takamatsu\*, N. Biedenkopf, V. Krähling, L. Kolesnikova, **S. Halwe**, S. Baumeister, S. Becker

Posterpräsentation beim 17. „*Negative Strand Virus Meeting*“ (NSV) in Verona (I)

03/2018

**New insights into trafficking of Marburg virus glycoprotein employing image analysis**

S. Halwe\*, S. Becker, O. Dolnik

Mündlicher Vortrag bei der 28. jährlichen Tagung der Gesellschaft für Virologie (GfV) in Würzburg

**The MARPHILI simulation: A scenario-based educational tool to sensitize high school students to infectious disease epidemics**

C. Rohde\*, M. Fligge, **S. Halwe**, M. Klüver, A. Köhler, M. Ringel, M. Elvert, H. Müller, J. Westmeier, N. Biedenkopf, T. Freitag, B. Lamp, G. Schudt, J. Scholten, M. Gollwitzer, S. Becker

Posterpräsentation bei der 28. jährlichen Tagung der Gesellschaft für Virologie (GfV) in Würzburg

09/2017

**Emerging Role of IQGAPs in Marburg virus infection**

O. Dolnik\*, J. Westmeier, **S. Halwe**, Y. Eroglu, S. Berghöfer, S. Becker

Posterpräsentation beim 9. Internationalen Filovirus Symposium in Marburg

- 06/2017**      **The role of the recycling endosome in intracellular transport of Marburg virus glycoprotein**  
S. Halwe\*, S. Becker, O. Dolnik  
 Mündlicher Vortrag bei der 36. jährlichen Tagung der „American Society for Virology“ (ASV) in Madison (WI, USA)
- 03/2017**      **Intracellular Transport of the Marburg virus glycoprotein**  
S. Halwe\*, S. Becker, O. Dolnik  
 Posterpräsentation bei der 27. jährlichen Tagung der Gesellschaft für Virologie (GfV) in Marburg
- 11/2016**      **Transport of Marburg virus glycoprotein is associated with the recycling endosome in non-polarized cells**  
S. Halwe\*, S. Becker, O. Dolnik  
 Mündlicher Vortrag beim 15. Workshop „Cell Biology and Viral Infection“ der Gesellschaft für Virologie (GfV) in Schöntal
- 06/2016**      **Transport of Marburg virus glycoprotein is associated with the recycling endosome in non-polarized cells**  
S. Halwe\*, S. Becker, O. Dolnik  
 Poster-Präsentation im Rahmen des Workshops „Bioimage Data Analysis“ am EMBL, Heidelberg
- 04/2016**      **Transport of Marburg virus glycoprotein is associated with the recycling endosome in non-polarized cells**  
S. Halwe\*, S. Becker, O. Dolnik  
 Mündlicher Vortrag bei der 26. jährlichen Tagung der Gesellschaft für Virologie (GfV) in Münster

\* präsentierender Autor





## VII Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren die Damen und Herren Professoren bzw. Privat-Dozenten:

Aigner, Bacher, S. Bauer, U. Bauer, Becker, Brehm, Daut, Decher, Dempfle, Dolnik, Einhäuser-Treyer, Elsässer, Feuser, Friebertshäuser, Garn, Garten, Greiner, Grzeschik, Huber, Jacob, Käuser, Klenk, Lill, Lingelbach, Lohöfer, Lohoff, Maisner, Milani, Müller, Oliver, Pankuweit, Parak, Plant, Preisig-Müller, Schnare, Schwarz, Slenczka, Steinhoff, Visekruna, Weber, Westermann



## VIII Ehrenwörtliche Erklärung

## IX Danksagung

Diese letzten Seiten möchte ich nutzen, um mich bei all denen zu bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt und mich während dieser Zeit begleitet haben.

Beginnen möchte ich mit Prof. Dr. Stephan Becker, der es mir ermöglicht hat, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Am Ende der Masterarbeit hatte ich das Gefühl, noch nicht fertig zu sein mit dem Thema „GP-Transport“ und aus diesem Grund bin ich sehr dankbar, dass ich die Möglichkeit erhalten habe, während der letzten Jahre dieses Projekt zu übernehmen und auch so frei bearbeiten zu können. Vielen Dank auch für die Gelegenheit, an verschiedenen nationalen und internationalen wissenschaftlichen Tagungen sowie einer Vielzahl an Workshops teilzunehmen und natürlich für die Möglichkeit, im BSL-4-Labor zu arbeiten, wovon ich seit den ersten Unterrichtsstunden zur Virologie in der neunten Klasse geträumt habe. All dies hat mich auch über den Rahmen dieser Arbeit hinaus geprägt. Insbesondere möchte ich mich, lieber Stephan, aber sehr herzlich für deine immerwährende Diskussionsbereitschaft, für deine vielen wertvollen Ideen und vor allem für deine außergewöhnliche Art des Umgangs bedanken, mit der du mir auch in mühsamen Phasen immer wieder neue Motivation gegeben hast!

Einen großen Dank möchte ich auch an PD Dr. Olga Dolnik aussprechen, die mich über die gesamte Zeit meiner Promotion begleitet und stets mit Rat und Tat zu Seite gestanden hat. Vielen Dank für deine Unterstützung bei all meinen Fragen, für viele hilfreiche Kommentare bei Anträgen, Vorträgen und Postern sowie insbesondere noch einmal für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Zudem möchte ich Verena Krähling, Dirk Becker und nochmals Olga Dolnik für die Einarbeitung ins BSL-4-Labor danken. Auch dem gesamten BSL-4-Team um Markus Eickmann, Olga Dolnik, Gotthard Ludwig und Michael Schmidt gebührt großer Dank für den täglichen reibungslosen Ablauf. Darüber hinaus bedanke ich mich sehr herzlich bei Yuki Takamatsu für seine Unterstützung bei den Live Cell Imaging-Aufnahmen sowie bei Nelly Mostajo Berrospi und Benjamin Koch für die Bereitstellung der Daten zur differentiellen Genregulation.

Diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die finanzielle Unterstützung der Jürgen Manchot-Stiftung, der ich für die Gewährung eines Promotionsstipendiums danken möchte.

Eine Doktorarbeit kann lang und mühevoll sein und aus diesem Grund ist es umso wichtiger, dass man ein angenehmes Umfeld vorfindet, in dem man gerne arbeitet. In diesem Sinne hätte das familiäre Umfeld im Institut für Virologie und insbesondere in der AG Becker nicht besser sein können, denn wenn Kollegen zu Freunden werden, machen Erfolge einfach doppelt so viel Spaß und Misserfolge sind

nur noch halb so schlimm. Während der letzten Jahre gab es vor allem zwei Gruppen, denen ich an dieser Stelle nicht nur für die tolle Zusammenarbeit im Labor danken möchte, sondern auch für die vielen schönen Stunden, die wir gemeinsam außerhalb der Arbeit verbracht haben und durch die Marburg in den letzten Jahren wirklich wie eine zweite Heimat für mich geworden ist.

Da wäre auf der einen Seite die Mittagstisch-Gruppe mit Cornelius, Nelly, Katharina und Jaana. Mit euch habe ich nicht nur die täglichen gemeinsamen Mittagessen im Labor genossen, sondern auch die Grill- und Kochabende nach der Arbeit (inklusive Gänseeier), GfV-Dinner (die auch mal bis 7 Uhr morgens gehen können), Freitagabende im Ulenspiegel (mit besonderer Vorsicht in Lollar) oder Wanderungen in Korbach (mit Jaanas „Tomatensaft“) werden unvergessliche Tage bleiben. Vielen Dank, dass ihr immer ein offenes Ohr hattet und für eure Unterstützung im und außerhalb des Labors. Die andere Gruppe umfasst Cornelius, Michael und Marc. In unterschiedlicher Konstellation haben wir gemeinsam nicht nur Paper veröffentlicht, Symposien organisiert, Marphili-Simulationen durchgeführt, Konferenzen in Deutschland und den USA besucht und uns um die Organisation und die Instandhaltung der verschiedenen Mikroskope gekümmert, sondern auch neben der Arbeit viele schöne Stunden beim Fußball/Football-Schauen, bei Spieleabenden oder einfach im Sudhaus verbracht. Auch euch danke ich für eure Unterstützung im und außerhalb des Labors.

Ein besonderer Dank geht an dieser Stelle an Corni, der fast gleichzeitig mit mir vor mittlerweile fast 7,5 Jahren in der AG Becker als Bachelorstudent aufgeschlagen ist und nun ebenfalls fast parallel zu mir seine Doktorarbeit fertiggestellt hat. Auch wenn wir einige erst überzeugen mussten, dass wir wirklich zwei Personen sind, habe ich die Zeit mit dir als Sitznachbarn wirklich genossen und ich bin froh, dass dies auch noch einige weitere Jahre so bleiben wird. Vielen Dank für deine Diskussionsbereitschaft, deine Teamfähigkeit und für die vielen Projekte, die wir erfolgreich gemeinsam angegangen sind und demnächst angehen werden.

Eine besonders angenehme Atmosphäre hat stets bei uns im sog. Altherren-Labor geherrscht (das mittlerweile allerdings eher weiblich dominiert ist). Für dieses tolle Umfeld möchte ich mich bei allen ehemaligen und aktuellen Kollegen bedanken, die stets dazu beigetragen haben, dass trotz Arbeitsstress der Spaß nicht zu kurz kam: Isabel, Victoria, Charlotte, Corni, Yuki, Jaana, Gordian, Erik und Michael.

Ein weiter großer Dank geht zudem an alle Studenten, die mich während der letzten Jahre unterstützt haben: Isabel, Victoria, Christopher, Julian und Nico.

Darüber hinaus möchte ich ausdrücklich allen TAs der AG danken, denn ohne die Zellkultur, Apothekenbestellungen, die vielen alltäglichen Hilfen und euer „Laborgedächtnis“ wäre vieles um einiges schwieriger gewesen: Astrid, Dirk, Katharina, Susanne, Martina, Jörg und Yonca.

Auch allen anderen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der AG Becker (aber auch des gesamten Instituts) möchte ich sehr herzlich für eure tägliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft danken: Alex 1, Alex 2, Anke, Anne, Clemens, Eva, Gertrud, Helen, Hosam, Kathi, Lucie, Larissa, Nadine, Svenja, Verena sowie allen Bachelor- und Masterstudenten.

Einen besonderen Dank möchte ich außerdem meinem ehemaligen Biologie-Lehrer am Wittekind-Gymnasium Lübbecke, Herrn Detlev Löttgen, aussprechen, der mich mit seinem ausgezeichneten Unterricht nicht nur das „Denken“ gelehrt, sondern auch für die Biologie begeistert hat.

Schließlich möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die mich stets auf meinem Weg unterstützt haben. Insbesondere Christian, Bene, Pogge, Robert, Jens und Celly, vielen Dank für eure Freundschaft, eure Unterstützung und dafür, dass ihr euch trotz der Entfernung immer wieder nach mir und meinen Fortschritten erkundigt habt. Ein spezieller Dank geht an Christian dafür, dass du mich zum Glück regelmäßig, wenn ich mal wieder in der Arbeit versunken war, daran erinnert hast, dass noch ein Leben außerhalb existiert. Allerbesten Dank dafür!

Auch wenn ich nicht so oft da sein kann, wie ich es gerne wäre, danke ich außerdem mit einem kräftigen „Gut Holz“ dem besten U40-Kegelverein aus Isenstedt für immer wieder schöne Ablenkungen vom Alltag.

Schließen möchte ich diese Arbeit mit dem wichtigsten Dank, der an meine Familie geht. Ohne eure fortwährende Unterstützung seit Kindesbeinen wäre der Abschluss dieser Doktorarbeit niemals möglich gewesen. Vielen, vielen Dank für eure Förderung und euer Vertrauen in mich!